

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CASSIA ROSANA RAMBO

ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE EXTRATOS DE DIFERENTES  
PARTES DO CEDRO (*Cedrela fissilis* Vell.)

PALOTINA

2019

CASSIA ROSANA RAMBO

ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE EXTRATOS DE DIFERENTES  
PARTES DO CEDRO (*Cedrela fissilis* Vell.)

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação Multicêntrico em Bioquímica e Biologia Molecular, Setor Palotina, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Biologia Molecular.

Orientador: Prof. Dr. Isac G. Rosset

PALOTINA

2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

R167 Rambo, Cassia Rosana  
Estudos fitoquímicos e biológico de extratos de diferentes partes do cedro (*Cedrela fissilis* Vell.) / Cassia Rosana Rambo - Palotina, 2019.  
119f.

Orientador: Isac G. Rosset  
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Paraná, Setor Palotina, Programa de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular.

1. Produtos naturais. 2. Alelopatia. 3. Atividade antimicrobiana. I. Rosset, Isac G. II. Universidade Federal do Paraná. III. Título.

CDU 577



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
SETOR PALOTINA  
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO MULTICÊNTRICO EM  
BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR - 33287015001P7

## TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MULTICÊNTRICO EM BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **CASSIA ROSANA RAMBO** intitulada: **ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DE EXTRATOS DE DIFERENTES PARTES DO CEDRO (*Cedrela fissilis* Vell.)**, sob orientação do Prof. Dr. ISAC GEORGE ROSSET, que após terem inquirido a aluna e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua Aprovação no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

PALOTINA, 04 de Dezembro de 2019.



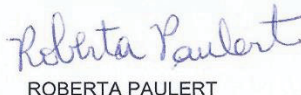
ISAC GEORGE ROSSET

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



ADRIANA FIORINI ROSADO

Avaliador Interno (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



ROBERTA PAULERT

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)



## **AGRADECIMENTOS**

Ao meu orientador, Prof. Dr. Isac G. Rosset, por todos os ensinamentos. Obrigada pela confiança, paciência e empatia.

Às professoras Dra. Roberta Paulert e Dra. Patrícia da Costa Zonetti por cederem seus laboratórios para execução do projeto, pela disponibilidade, pelas contribuições e correções.

À Prof.<sup>a</sup> Adriana Fiorini por todos os ensinamentos e correções. Obrigada por toda a atenção e pela empatia.

À Universidade Federal do Paraná (UFPR) e aos professores do Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biologia Molecular por buscarem ao máximo uma educação de qualidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e a Fundação Araucária pelo suporte financeiro à pesquisa.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a execução do projeto, que auxiliaram ou ensinaram. Agradeço também por todas as palavras de apoio e incentivo durante a minha trajetória.

Minha gratidão a todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

“A história será gentil comigo  
porque pretendo escrevê-la.”

**Winston Churchill**

## RESUMO

Os produtos naturais são fontes de grande diversidade de moléculas com potencial farmacêutico e agrícola. No Paraná, o bioma Mata Atlântica apresenta biodiversidade muito rica. Uma das plantas nativas desse bioma e comumente encontrada no Paraná é o cedro. Ele é utilizado na medicina popular, mas pouco caracterizado e testado quanto às suas propriedades, apesar de demonstradas algumas atividades biológicas importantes. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi realizar um estudo fitoquímico e biológico de extratos de diferentes partes do cedro (*Cedrela fissilis* Vell.). Para isto, foram coletadas amostras de folhas, pecíolos, cascas do caule e raízes. As amostras de cada uma das partes passaram por extrações aquosas, através de três métodos, e extrações orgânicas com quatro solventes diferentes. Então os extratos foram caracterizados através de cromatografia em camada delgada, análise do conteúdo de compostos fenólicos, conteúdo de flavonoides e avaliação da atividade antioxidante. Foram realizados testes antimicrobianos contra *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans* e teste alelopático contra a planta daninha *Ipomoea nil*. As extrações resultaram em 16 extratos orgânicos e 12 extratos aquosos. Nestes extratos foram detectados terpenos, antraquinonas, cumarinas, compostos fenólicos e taninos. As maiores concentrações de compostos fenólicos foram observadas nos extratos aquosos e nos extratos orgânicos de maior polaridade. No teste de atividade antioxidante observou-se um perfil muito semelhante. Não foram detectados flavonoides nos extratos orgânicos e, nos extratos aquosos, as concentrações foram baixas. Nos testes antimicrobianos, todas as partes da planta demonstraram alguma atividade, tendo maior atividade observada no extrato acetônico das cascas. No teste alelopático, os extratos orgânicos reduziram a germinação e o crescimento da *I. nil*, onde a porcentagem de germinação foi reduzida em até 18,8%. Os resultados mais promissores foram demonstrados pelos extratos das raízes do cedro. Este trabalho demonstrou a atividade antimicrobiana e alelopática do cedro, evidenciando o potencial desta espécie como fonte de moléculas ativas.

Palavras-chave: Produtos naturais. Alelopatia. Atividade antimicrobiana.

## ABSTRACT

Natural products are sources of a great diversity of molecules that have pharmaceutical and agricultural potential. In Paraná state, the Atlantic Forest has a rich biodiversity. A native plant that is commonly found in Paraná is Cedro. It has been used in folk medicine for many years, but not a lot of studies have been done, even though Cedro demonstrates some important biological activities. Therefore, this work aimed to perform a phytochemical and biological study of extracts from different parts of the Cedro tree (*Cedrela fissilis* Vell.). Leaves, stems, bark and root samples were collected. Samples from each part of the tree were subjected to aqueous extractions using three methods and organic extractions with four different solvents. The extracts were separated by thin layer chromatography and analyzed for phenolic compounds content, flavonoid content, and evaluation of the antioxidant activity. Antimicrobial tests were performed against *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, and *Candida albicans*. Allelopathic test was performed against the weed *Ipomoea nil*. This resulted in 16 organic extracts and 12 aqueous extracts. The presence of terpenes, anthraquinones, coumarins, phenolic compounds, and tannins were detected. Higher concentrations of phenolic compounds were observed in aqueous extracts and in polar organic extracts. In the antioxidant test, a very similar profile was observed. Flavonoids weren't detected in organic extracts and aqueous extracts showed low concentrations. In antimicrobial tests, all Cedro parts showed some level of activity with acetone bark extract being the most active. In the allelopathic tests, organic extracts reduced *I. nil* germination and growth, and the germination percentage was reduced by up to 18.8%. The best results were found in root extracts. This work demonstrated Cedro's antimicrobial and allelopathic activities, highlighting the potential of this species as a source of active molecules.

Keywords: Natural products. Allelopathy. Antimicrobial activity.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura do ácido salicílico (A) e do ácido acetilsalicílico (B).....	22
Figura 2 – Estrutura do ácido chiquímico (A) e do oseltamivir (B).....	23
Figura 3 – Exemplos de alcaloides.....	23
Figura 4 – Estrutura do paclitaxel.....	24
Figura 5 – Estrutura do artemisinina .....	25
Figura 6 – Exemplos de compostos fenólicos .....	25
Figura 7 – Exemplos de flavonoides .....	27
Figura 8 – Exemplos de terpenos.....	28
Figura 9 – Estrutura da leptospermona e da mesotriona .....	29
Figura 10 – Remanescentes florestais da Mata Atlântica no estado do Paraná - Período 2017-2018.....	30
Figura 11 – Erva-baleeira .....	31
Figura 12 – Ora-pro-nóbis .....	32
Figura 13 – Erva-mate.....	33
Figura 14 – Pata-de-vaca .....	34
Figura 15 – Cedro .....	38
Figura 16 – Folhas, frutos e flores do cedro .....	39
Figura 17 – Extrator de Soxhlet.....	45
Figura 18 – Aspecto dos extratos secos das folhas de cedro em acetato de etila (A) e dos pecíolos em acetona (B) obtidos por Soxhlet .....	58
Figura 19 – Aspecto dos extratos secos das cascas de cedro em hexano (A), acetona (B) e etanol (C) obtidos por Soxhlet.....	59
Figura 20 – Extratos secos das raízes do cedro em acetato de etila (A) e acetona (B) obtidos por Soxhlet.....	59
Figura 21 – Varredura dos extratos orgânicos do cedro .....	63
Figura 22 – Varredura dos extratos orgânicos do cedro .....	64
Figura 23 – Atividade do extrato acetônico das cascas do cedro frente a <i>E. coli</i> (A), <i>P. aeruginosa</i> (B), <i>S. aureus</i> (C) e <i>C. albicans</i> (D).....	80
Figura 24 – Bioautografia dos extratos orgânicos das folhas do cedro .....	83
Figura 25 – Bioautografia dos extratos orgânicos dos pecíolos do cedro .....	84
Figura 26 – Bioautografia dos extratos orgânicos das cascas do cedro .....	85
Figura 27 – Bioautografia dos extratos orgânicos das raízes do cedro.....	86

Figura 28 – Total de sementes germinadas ao longo do teste de atividade alelopática com extratos do cedro .....	92
--	----

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Rendimento das extrações orgânicas por Soxhlet (A) e aquosas (B) das diferentes partes do cedro.....	61
Gráfico 2 – Curva analítica para determinação de compostos fenólicos nos extratos orgânicos (A) e aquosos (B).....	65
Gráfico 3 – Concentração de compostos fenólicos nos extratos orgânicos do cedro.....	66
Gráfico 4 – Concentração de compostos fenólicos nos extratos aquosos do cedro .....	67
Gráfico 5 – Curva analítica para determinação de flavonoides nos extratos orgânicos do cedro .....	69
Gráfico 6 – Curva analítica para determinação de flavonoides nos extratos aquosos .....	70
Gráfico 7 – Concentração de flavonoides nos extratos aquosos do cedro.....	70
Gráfico 8 – Atividade antioxidante dos extratos orgânicos do cedro .....	72
Gráfico 9 – Atividade antioxidante dos extratos aquosos do cedro .....	73

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Enquadramento taxonômico do gênero <i>Cedrela</i> .....	35
Quadro 2 – Metodologias para extração do material vegetal do cedro .....	45
Quadro 3 – Extração sequencial em aparato de Soxhlet .....	46

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Compostos presentes no cedro.....	40
Tabela 2 – Propriedades dos solventes utilizados nas extrações .....	46
Tabela 3 – Soluções amostra dos extratos orgânicos do cedro para caracterização.....	48
Tabela 4 – Soluções amostra dos extratos orgânicos do cedro para teste de atividade antioxidante.....	50
Tabela 5 – Reveladores utilizados na cromatografia por camada delgada .....	52
Tabela 6 – Soluções amostra dos extratos orgânicos do cedro para teste de atividade alelopática .....	55
Tabela 7 – Rendimento das extrações orgânicas do cedro (% m/m) .....	60
Tabela 8 – Rendimento das extrações aquosas do cedro (% m/m) .....	61
Tabela 9 – Grupos de compostos presentes nos extratos orgânicos do cedro .....	76
Tabela 10 – Grupos de compostos presentes nos extratos aquosos do cedro .....	76
Tabela 11 – Atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos do cedro pelo método de difusão em poços .....	79
Tabela 12– Inibição do crescimento de microrganismos pelos extratos orgânicos do cedro .....	81
Tabela 13– Inibição do crescimento de microrganismos pelos extratos aquosos do cedro .....	82
Tabela 14 –Teste alelopático dos extratos orgânicos (0,5% m/v) do cedro .....	93
Tabela 15 –Teste alelopático dos extratos aquosos do cedro.....	93

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%G	- Porcentagem de germinação
®	- Marca registrada
AlCl <sub>3</sub>	- Cloreto de Alumínio
ATCC	- <i>American Type Culture Collection</i>
BHI	- <i>Brain Heart Infusion</i>
C.a.	- <i>Candida albicans</i>
CCD	- Cromatografia em camada delgada
CV	- Coeficiente de variação
DMSO	- Dimetilsulfóxido
DPPH	- 2,2-difenil-1-picrilhidrazila
E.c.	- <i>Escherichia coli</i>
EAG	- Equivalentes de ácido gálico
EQ	- Equivalentes de quercetina
IVG	- Índice de velocidade de germinação
MH	- Müller-Hinton
nm	- Nanômetros
OMS	- Organização Mundial da Saúde
P.a.	- <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
ppm	- Partes por milhão
qsp	- Quantidade suficiente para
RAS	- Regras de análise de sementes
RENAME	- Relação Nacional de Medicamentos Essenciais
RENISUS	- Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS
S.a.	- <i>Staphylococcus aureus</i>
SISGEN	- Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado
SUS	- Sistema Único de Saúde
™	- Marca registrada
UFC	- Unidades formadoras de colônias
UI	- Unidades internacionais
UV	- Ultravioleta
λ	- Comprimento de onda



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>16</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>18</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	18
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
<b>3</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
3.1	PLANTAS MEDICINAIS.....	19
3.2	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS .....	21
3.3	ESTADO DO PARANÁ: BIODIVERSIDADE.....	29
3.4	GÊNERO <i>CEDRELA</i> .....	34
3.5	CEDRO.....	37
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>44</b>
4.1	REAGENTES E EQUIPAMENTOS .....	44
4.2	COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL .....	44
4.3	EXTRAÇÕES.....	45
4.4	CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS.....	47
4.4.1	Conteúdo de compostos fenólicos.....	48
4.4.2	Conteúdo total de flavonoides .....	49
4.4.3	Atividade antioxidante.....	50
4.4.4	Caracterização por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) .....	51
4.5	TESTES ANTIMICROBIANOS .....	52
4.5.1	Difusão em poços .....	53
4.5.2	Bioautografia direta.....	53
4.6	TESTE ALELOPÁTICO .....	54
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>57</b>
5.1	EXTRAÇÕES.....	57
5.2	CARACTERIZAÇÃO.....	62
5.2.1	Espectros de varredura.....	62
5.2.2	Conteúdo de compostos fenólicos.....	64
5.2.3	Conteúdo total de flavonoides .....	68
5.2.4	Atividade antioxidante.....	71
5.2.5	Caracterização por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) .....	75
5.3	TESTES ANTIMICROBIANOS .....	78

5.4	TESTE ALELOPÁTICO .....	91
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	97
	REFERÊNCIAS .....	98
	APÊNDICE – <i>SCREENING</i> DOS EXTRATOS ORGÂNICOS DO CEDRO..	116

## 1 INTRODUÇÃO

Desde os primórdios da química medicinal, os produtos naturais são fontes de compostos ativos com potencial terapêutico ou de moléculas usadas como base para desenvolvimento de fármacos. Alguns motivos que explicam isso são: a diversidade e a complexidade estrutural das moléculas produzidas pelos organismos vivos; os mecanismos de ação complexos, envolvendo várias rotas de sinalização e a ocorrência de sinergismo entre os compostos presentes (CORSON; CREWS, 2007; YUNES; CECHINEL FILHO, 2016). Dentre os produtos naturais, os metabólitos secundários isolados de plantas superiores têm se mostrado muito úteis na busca de novos agentes com atividade terapêutica (QUEIROZ et al., 2014; ATANASOV et al., 2015).

Além do potencial farmacológico, os metabólitos secundários podem ser úteis no campo agrônomo se possuírem atividades herbicidas, fungicidas ou inseticidas. O uso de pesticidas naturais vem ganhando espaço devido ao apelo por tecnologias verdes, já que estes compostos costumam ser de fácil degradação e menor impacto ambiental (MORAES et al., 2016).

Apesar do grande potencial, estima-se que apenas 5 a 15% do total das espécies vegetais foi investigado. Esse fato, associado aos registros de fármacos importantes descobertos a partir de produtos naturais e o baixo número de novas moléculas ativas desenvolvidas pelas companhias farmacêuticas, demonstra a importância da investigação da biodiversidade por atividades biológicas (CRAGG; NEWMAN, 2016; BERNARDES et al., 2017).

A Mata Atlântica possui uma diversidade de fauna e flora muito rica, incluindo muitas espécies endêmicas, restritas ao bioma. Mas este é um bioma que foi muito devastado, atualmente encontra-se limitado a pequenas áreas remanescentes (MYERS et al., 2000). Com isso, a biodiversidade está sendo perdida, sem que toda sua diversidade química e potencial biológico tenham sido investigados.

O cedro (*Cedrella fissilis* Vell.) é uma destas espécies nativas da Mata Atlântica que ainda não foi extensivamente estudada. Podem ser encontrados relatos de diferentes usos medicinais e alguns estudos relatando propriedades úteis da planta e descrevendo sua diversidade química. Mas estes estudos são escassos,

não avaliam todos os usos medicinais citados pela etnofarmacologia, ainda há um leque de possibilidades para estudos fitoquímicos e biológicos com o cedro.

Com a proposta de expandir o entendimento sobre essa espécie, o presente trabalho tem por objetivo realizar um estudo fitoquímico e biológico de extratos de diferentes partes do cedro. Para tanto, os extratos das folhas, pecíolos, cascas e raízes foram submetidos a caracterização fitoquímica, testes de inibição de microrganismos patogênicos e teste alelopático.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar um estudo fitoquímico e biológico de extratos de diferentes partes do cedro (*Cedrela fissilis* Vell.).

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter extratos brutos a partir das folhas, pecíolos, cascas e raízes do cedro;
- Realizar a caracterização fitoquímica dos extratos obtidos;
- Investigar a atividade antimicrobiana dos extratos contra microrganismos patogênicos;
- Investigar o potencial dos extratos em inibir o crescimento e a germinação de plantas daninhas;
- Comparar os perfis de metabólitos presentes e as atividades observadas entre os diferentes extratos;

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 PLANTAS MEDICINAIS

O uso de produtos naturais para alívio de doenças e melhora de problemas de saúde é uma prática muito antiga, transmitida ao longo de gerações através da medicina tradicional (OLIVEIRA et al., 2012; MA et al., 2017). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) (2000, p. 1, tradução nossa), medicina tradicional pode ser definida como

“[...] soma dos conhecimentos, habilidades e práticas baseados nas teorias, crenças e experiências indígenas e de diferentes culturas, explicáveis ou não, usadas na manutenção da saúde, bem como na prevenção, diagnóstico, melhora ou tratamento de doenças físicas ou mentais.”

Os preparados caseiros são bastante difundidos em função do baixo custo e da facilidade de acesso às plantas. Populações de países em desenvolvimento e populações indígenas utilizam o conhecimento sobre as plantas como fonte primária de assistência médica, podendo ser a única opção de tratamento em muitos casos (BALICK; MENDELSON, 1992; SAHOO; MANCHIKANTI; DEY, 2010; QUEIROZ et al., 2014). Além disso, costumam apresentar baixos riscos e efeitos colaterais menos severos em comparação às drogas sintéticas (WINK, 2015; MUKHERJEE et al., 2017).

A OMS estima que em torno de 80% da população mundial utiliza alguma planta medicinal para alívio de problemas de saúde (FARNSWORTH et al., 1985). Oliveira e outros (2012) relataram que mais de 90% das pessoas já utilizaram alguma planta medicinal pelo menos uma vez. Além disso, Harnack, Rydell e Stang (2001) constataram que quase dois terços das pessoas haviam usado algum preparado de ervas no período de um ano.

As plantas medicinais são comumente usadas em condições de saúde menos severas sem recomendação médica. Contudo, em alguns casos, profissionais de saúde recomendam o uso de infusões e outras preparações e recomendações podem ser encontradas em farmacopeias de diferentes países (PETROVSKA, 2012; WINK, 2015).



No Brasil, foi criada a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos que tem entre seus objetivos: inserir e promover a utilização de fitoterápicos e plantas medicinais no SUS (Sistema Único de Saúde); incentivar a pesquisa com plantas medicinais e fitoterápicos, o desenvolvimento de tecnologias e a inovação nesse campo; estabelecer diretrizes para a regulamentação do comércio desses produtos, além de promover o uso sustentável da biodiversidade (BRASIL, 2006; BRASIL, 2008). Dentro do programa, foi desenvolvida a Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) que inclui 71 plantas como prioritárias para estudos e pesquisas (BRASIL, 2009). Após 10 anos da criação, o programa publicou as primeiras monografias:

- Alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.): indicado como antisséptico e antimicrobiano de uso tópico (BRASIL, 2018a);
- Eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill.): usado principalmente devido a suas atividades antioxidante, antimicrobiana e hipoglicemiante (BRASIL, 2018b);
- Guaco (*Mikania glomerata* Spreng.): utilizado pelo efeito terapêutico em doenças respiratórias (BRASIL, 2018c).

Outras monografias constam no Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira. Publicado em 2016, esse documento descreve os usos de 28 plantas e fitoterápicos buscando orientar a prescrição adequada desses produtos (BRASIL, 2016). Além disso, algumas plantas medicinais constam no RENAME (Relação Nacional de Medicamentos Essenciais). O RENAME estabelece os medicamentos e produtos naturais disponíveis pelo SUS, entre as plantas disponibilizadas estão: alcachofra (*Cynara scolymus* L.), aroeira (*Schinus terebinthifolia* Raddi); espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek) e guaco (*Mikania glomerata* Spreng.) (BRASIL, 2018d).

Neste interim, foi aprovado pelo Congresso Nacional o Marco Legal da Biodiversidade (Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015) que lançou as diretrizes para as pesquisas envolvendo a biodiversidade brasileira e o conhecimento tradicional associado, com o objetivo de regularizar a dinâmica das pesquisas nessa área (BRASIL, 2015).

As políticas brasileiras, apesar de bastante recentes, foram importantes para estimular o uso sustentável da biodiversidade nas últimas décadas. Em contrapartida, é possível encontrar registros muito antigos que já descreviam o uso

das plantas para melhora da saúde humana. Registros chineses com data de aproximadamente 2500 a.C. relatam o uso de plantas medicinais, incluindo plantas usadas até hoje como o ginseng (*Panax ginseng* C. A. Meyer) e a cânfora (*Cinnamomum camphora* (L.) J.Presl) (PETROVSKA, 2012). Esse uso era baseado em observações empíricas, apenas no século XVIII as propriedades dessas plantas e seus compostos ativos começaram a ser estudados (ATANASOV et al., 2015).

### 3.2 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Com o início dos estudos das plantas com atividades importantes para a humanidade, logo ficou claro que estas atividades estavam diretamente relacionadas à composição química. As plantas medicinais possuem uma complexidade de compostos químicos, podendo apresentar como princípio ativo mais de uma substância. Este perfil pode variar de acordo com a espécie da planta, além de condições de cultivo, coleta e armazenamento, fatores fisiológicos e ambientais como clima, solo e presença de herbívoros ou outras fontes de estresse (SAHOO; MANCHIKANTI; DEY, 2010; ATANASOV et al., 2015; GOUVEA et al., 2016).

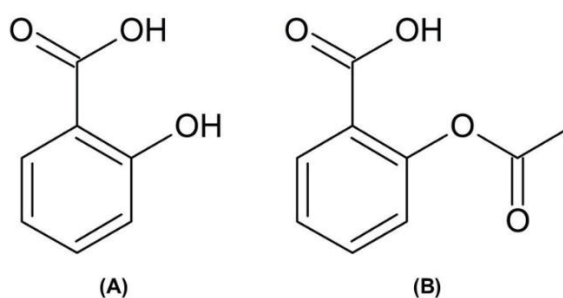
Os metabólitos secundários são responsáveis pela defesa da planta contra patógenos e herbívoros, atração de dispersores de sementes ou polinizadores, além de serem importantes na competição com outras plantas (alelopatia) e nas simbioses com microrganismos (TAIZ; ZEIGER, 2009). Também são responsáveis pela adaptação às diferentes condições ambientais como: estresse hídrico, radiação ultravioleta e composição atmosférica (GOUVEA et al., 2016). Ou seja, o metabolismo secundário é responsável por aumentar a capacidade de competição, sobrevivência e propagação das plantas (WINK, 2015). De maneira geral, esses compostos apresentam “estrutura complexa, baixa massa molecular, atividades biológicas marcantes e [...] são encontrados em concentrações relativamente baixas [...]” (van POSER, 2017, p.23-24).

A maior parte dos produtos naturais demonstra atividade biológica contra tumores, colesterol e doenças causadas por vírus e bactérias (YUNES; CECHINEL FILHO, 2016), e outras atividades que justificam seu uso na medicina popular. De acordo com Firn e Jones (2003), quanto maior a diversidade de compostos produzidos por um organismo, maior a probabilidade de um desses compostos ter uma atividade biológica importante. Muitos fármacos importantes na medicina

moderna foram descobertos em produtos naturais ou produzidos a partir dos compostos encontrados neles. Os produtos naturais incluem moléculas obtidas a partir de plantas, micro-organismos ou animais e também moléculas produzidas de forma sintética ou semissintética a partir das isoladas nos organismos (HARVEY, 2008).

Um exemplo clássico de medicamento semissintético é o ácido acetilsalicílico (Figura 1B), que é produzido a partir da acetilação do ácido salicílico natural isolado da *Filipendula ulmaria* (L.) Maxim (Figura 1A). A planta era conhecida por suas propriedades anti-inflamatórias e analgésicas, a partir da qual foi isolada a substância. O composto semissintético é comercializado como Aspirina® e usado até hoje como analgésico e anti-inflamatório, no controle da febre, artrite reumatoide e como inibidor da agregação plaquetária (VIEGAS JR; BOLZANI; BARREIRO, 2006; QUEIROZ et al., 2014).

Figura 1 – Estrutura do ácido salicílico (A) e do ácido acetilsalicílico (B)



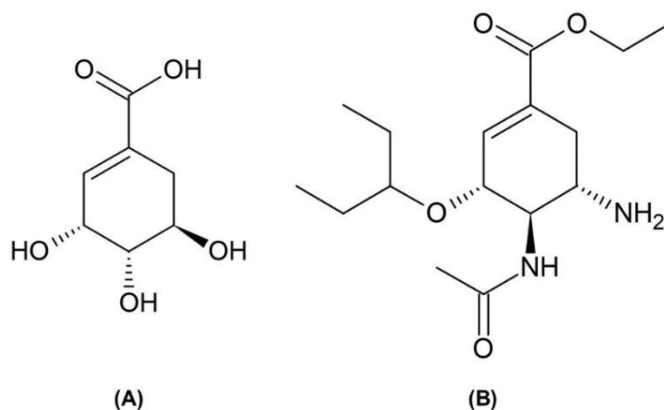
FONTE: A autora (2019).

Outro medicamento semissintético importante é o Tamiflu® (Fosfato de oseltamivir) (Figura 2B). O medicamento é comercializado desde 1999, indicado contra influências do tipo A e B; e é produzido a partir do ácido chiquímico (Figura 2A) extraído de plantas do gênero *Illicium* (FARINA; BROWN, 2006).

A morfina foi um dos primeiros alcaloides isolados de plantas, é um potente narcótico e analgésico e tem sido comercializada desde 1826 para amenizar dores intensas (CRAGG; GROTHAUS; NEWMAN, 2014; QUEIROZ et al., 2014; SANTOS; REICHERT; SANTOS, 2017). Os alcaloides (Figura 3) são compostos nitrogenados, apresentam um ou mais nitrogênios em sua estrutura química e costumam ser os metabólitos secundários mais ativos, atuando principalmente sobre o sistema nervoso central (WINK, 2015). A morfina foi isolada a partir do ópio da papoula

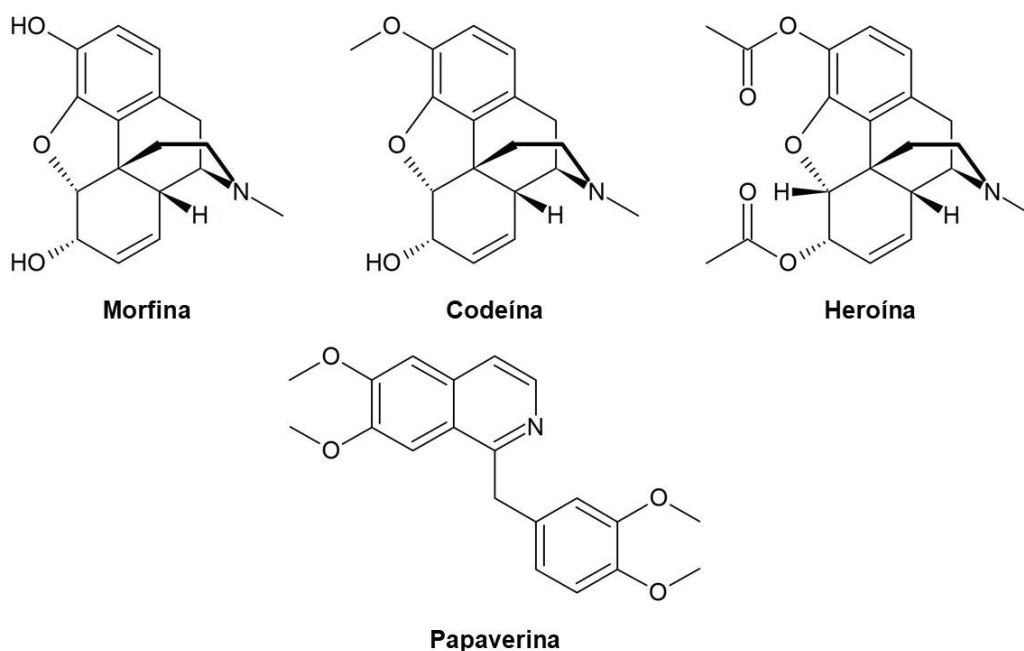
(*Papaver somniferum* L.) por Friedrich Sertürner no início do século XIX (ATANASOV et al., 2015), mas os primeiros registros de uso da papoula datam de em torno de 2600 a. C., na antiga Mesopotâmia (CRAGG; NEWMAN, 2013).

Figura 2 – Estrutura do ácido chiquímico (A) e do oseltamivir (B)



FONTE: A autora (2019).

Figura 3 – Exemplos de alcaloides



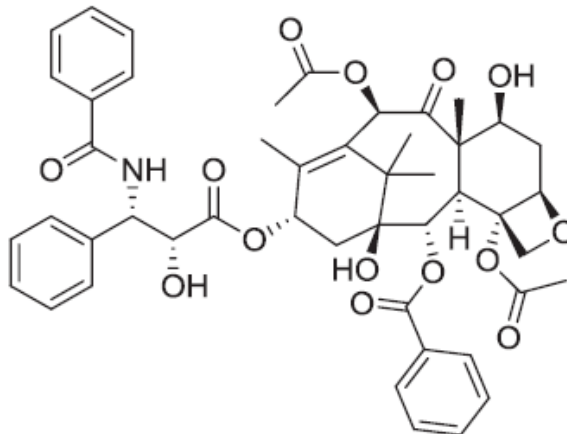
FONTE: A autora (2019).

Além disso, a *P. somniferum* também é fonte de outros alcaloides farmacologicamente importantes como a codeína, usada como analgésica e contra tosses; e a papaverina, cuja estrutura foi utilizada para a semissíntese do verapamil, usado como anti-hipertensivo (FABRICANT; FARNSWORTH, 2001). A própria molécula da morfina foi usada no desenvolvimento de fármacos semissintéticos,

como oxicodona e diacetilmorfina (Figura 3). Esta última, devido ao seu alto poder de causar dependência, tornou-se droga de abuso, conhecida como heroína (BERNARDES et al., 2017).

A investigação de organismos vivos buscando novos compostos ou atividades úteis ao ser humano, é conhecida como bioprospecção. Muitas vezes esta investigação envolve a biodiversidade de uma região e o conhecimento tradicional associado a ela (ORMOND, 2019). Buscando novas moléculas para o tratamento do câncer a partir de um trabalho de bioprospecção, o paclitaxel (Figura 4) foi isolado das cascas do caule da árvore *Taxus brevifolia* Nutt. em 1971 (WANI et al., 1971). Esta substância combate o câncer através da interrupção do processo de multiplicação celular (BERNARDES et al., 2017). O composto é um terpeno cuja síntese completa seria complexa e economicamente inviável, demonstrando a viabilidade de pesquisas com produtos naturais, mesmo para doenças de difícil tratamento como o câncer.

Figura 4 – Estrutura do paclitaxel

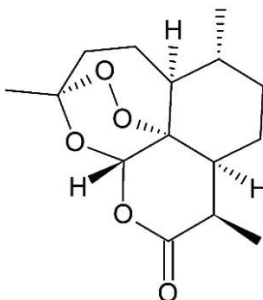


FONTE: ATANASOV et al. (2015).

Trabalhos mais recentes ainda utilizam a bioprospecção para o desenvolvimento de novos medicamentos. Uma equipe de pesquisadores chineses iniciou uma busca por um novo fármaco para combate da malária, pois o protozoário causador da doença estava se tornando resistente as moléculas em utilização. A pesquisa começou com mais de 2000 plantas e chegou a um extrato ativo, obtido da planta *Artemisia annua* L. (TU, 2011). Com auxílio de textos antigos da Medicina Tradicional Chinesa, a molécula da artemisinina (Figura 5) foi isolada, tendo sua

eficácia e segurança comprovadas (CRAGG; NEWMAN, 2013; TU, 2011). O trabalho rendeu à YouYou Tu, pesquisadora responsável pelo projeto, o Prêmio Nobel em Fisiologia e Medicina de 2015 (MCKERROW, 2015).

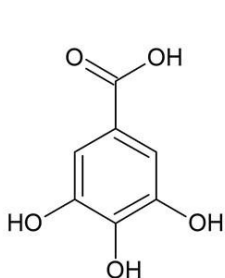
Figura 5 – Estrutura do artemisinina



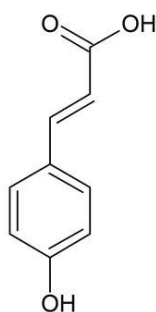
FONTE: A autora (2019).

Os compostos fenólicos são outra classe de metabólitos secundários importantes para a saúde humana (Figura 6). Amplamente difundidos entre os gêneros vegetais, apresentam diversas estruturas químicas, e importantes funções para as plantas que os produzem, já que podem conferir proteção contra herbívoros e outros patógenos, podem atrair polinizadores e dispersores das sementes, protegem contra danos causados pela radiação ultravioleta, além de atividade alelopática, reduzindo crescimento de plantas competidoras (TAIZ; ZEIGER, 2009).

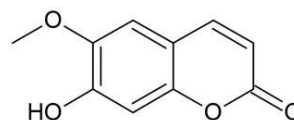
Figura 6 – Exemplos de compostos fenólicos



**Ácido gálico**



**Ácido *p*-cumárico**



**Escopoletina**

FONTE: A autora (2019).

Devido à presença de uma ou mais hidroxilas ligadas à um anel aromático em sua estrutura química, os compostos fenólicos são naturalmente antioxidantes



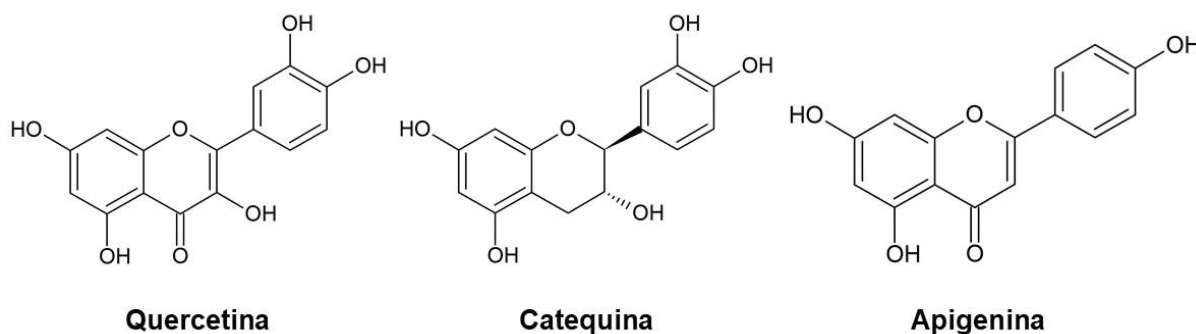
(RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997). Um antioxidante é um composto capaz de impedir um processo de oxidação. Quando compostos oxidantes se acumulam, tem-se um processo chamado de estresse oxidativo, que agride as membranas e outras biomoléculas (KOHEN; NYSKA, 2002).

O chá (*Camellia sinensis* (L.) Kuntze) é uma das bebidas mais consumidas mundialmente, são mais de dois milhões de xícaras consumidas por dia (DREW, 2019). Esse consumo se deve aos benefícios dos metabólitos secundários presentes, principalmente catequinas (EISENSTEIN, 2019). As catequinas são compostos fenólicos que, por sua atividade antioxidante, são capazes de atuar reduzindo o estresse oxidativo do organismo e doenças crônicas decorrentes dele, como problemas cardiovasculares e câncer (SHAHIDI; AMBIGAIPALAN, 2015).

Outra bebida muito consumida pela presença de polifenóis é o vinho. Os polifenóis presentes no vinho tinto possuem efeito cardioprotetivo (CORDER et al., 2001). Além disso, o vinho é conhecido pela presença de resveratrol, um composto fenólico, que pode ser encontrado também em uvas e amoras, possui propriedades antioxidantes marcantes, é anti-inflamatório e tem efeito benéfico sobre várias doenças crônicas, incluindo câncer e doenças neurodegenerativas (PHARM et al., 2014; BASTIANETTO; MÉNARD; QUIRION, 2015; DIAZ-GEREVINI et al., 2016; VARONI et al., 2016).

Os flavonoides são metabólitos importantes para as plantas, já que além da pigmentação de flores e frutos, atuam como atrativo para polinizadores e dispersores de sementes, alguns flavonoides também protegem a planta contra radiação ultravioleta, insetos e microrganismos patogênicos (TAIZ; ZEIGER, 2009). Possuem em torno de 15 carbonos em sua estrutura fundamental, na forma de dois grupamentos fenil ligados por uma cadeia de três carbonos (Figura 7), possuindo propriedades antioxidante, antitumoral, antimicrobiana, contra alergias e inflamações, além de atuarem na modulação de enzimas e rotas enzimáticas importantes no metabolismo (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997; NIJVELDT, et al., 2001; STALIKAS, 2007; ZUANAZZI; MONTANHA; ZUCOLOTTI, 2017).

Figura 7 – Exemplos de flavonoides



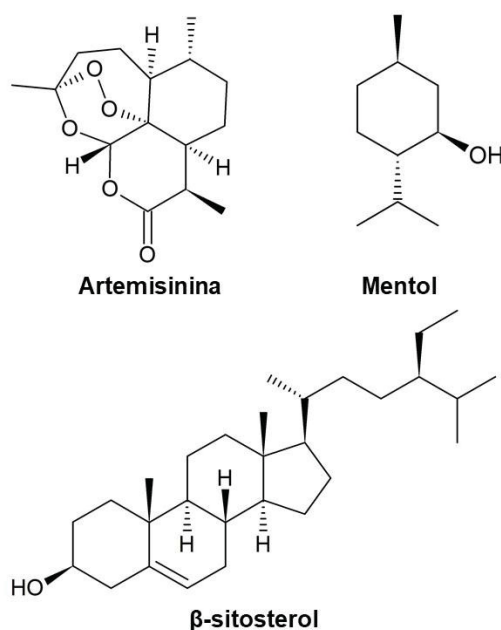
FONTE: A autora (2019).

O extrato das folhas de ginkgo (*Ginkgo biloba* L.) é indicado para distúrbios do sistema circulatório, uma vez que o extrato é composto principalmente por flavonoides, com atividade antioxidante notável, e também por terpenos, que são capazes de inibir o fator de ativação plaquetária (ZUANAZZI; MONTANHA; ZUCOLOTTI, 2017).

Os terpenos também são produtos do metabolismo secundário das plantas. Sua principal característica é que são sintetizados a partir de unidades isoprênicas, com 5 átomos de carbono e classificados pelo número de átomos de carbonos presentes na molécula (Figura 8). Por exemplo, os monoterpenos possuem 10 carbonos, os sesquiterpenos, 15 carbonos e os triterpenos, 30 carbonos (TAIZ; ZEIGER, 2009). A azadiractina é um dos triterpenoides produzidos pela *Azadirachta indica* A. Juss., árvore conhecida como neem. Esta substância tem atividade inseticida comprovada e apresenta potencial como inseticida comercial graças a sua baixa toxicidade para mamíferos (AERTS; MORDUE, 1997; TAIZ; ZEIGER, 2009).

Os terpenos mais comuns são os óleos essenciais ou óleos voláteis, que são responsáveis pelo aroma característico de muitas plantas. São compostos principalmente por monoterpenos e sesquiterpenos e produzidos pelas plantas sobretudo para afastar herbívoros. A hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.) é uma planta que produz e armazena óleos essenciais em suas folhas. O óleo possui atividade antimicrobiana e seu principal constituinte é o mentol (HEINZANN; SPITZER; SIMÕES, 2017).

Figura 8 – Exemplos de terpenos



FONTE: A autora (2019).

Alguns metabolitos secundários podem atuar como herbicidas naturais ou impedindo a germinação de outras espécies. Estas moléculas são chamadas de alelopáticas e possuem um grande potencial agrícola, já que as pragas e plantas daninhas são responsáveis por grandes perdas de produtividade (BARBOSA; PIVELLO; MEIRELLES, 2008; MACEDO et al., 2017).

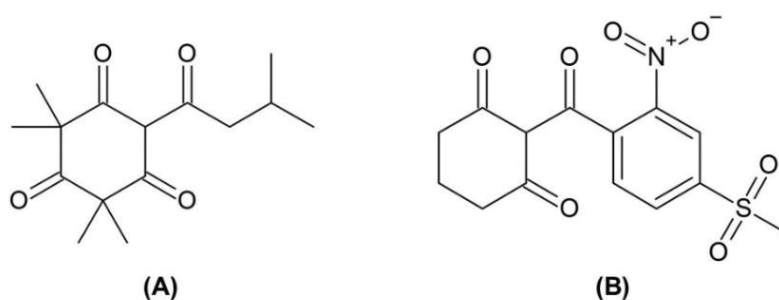
Alelopatia é definida como o processo em que uma planta libera no ambiente metabólitos que possam afetar plantas próximas a ela. Uma planta produz compostos alelopáticos para melhorar a competição com outras plantas, podendo reduzir o crescimento das plantas vizinhas pela liberação de compostos químicos no solo, aumentando seu acesso à luz, água e nutrientes. De modo geral, o termo é usado para efeitos nocivos sobre outras plantas, mas a definição inclui efeitos benéficos e efeitos sobre plantas da mesma espécie (TAIZ; ZEIGER, 2009; van POSER, 2017).

Trabalhos recentes demonstraram o potencial alelopático de diferentes espécies do gênero *Eucalyptus*, conhecidas pela baixa incidência de plantas invasoras (CARVALHO et al., 2015; GHNAYA et al., 2015; QIN, LIU e YU, 2018; de SOUSA et al., 2018). Algumas gimnospermas são capazes de expelir uma quantidade de compostos fenólicos suficiente para que a concentração encontrada no solo seja tóxica para outras plantas (MACÍAS et al., 2007). A atividade alelopática

desses compostos, como ácido cafeico e ácido ferúlico, ocorre por diferentes mecanismos, podendo afetar a taxa de fotossíntese de outras plantas, sua síntese proteica, absorção de água e nutrientes e outros processos importantes para o desenvolvimento (HOLAPPA; BLUM, 1991; EINHELLIG, 1994; BLUM, 2004).

A mesotriona (Callisto™) é um herbicida comercial amplamente usado contra plantas daninhas em culturas de milho, é um análogo sintético da leptospermona encontrada na planta *Callistemon citrinus* (Curtis) Skeels (CORNES, 2006). Após observar que poucas plantas cresciam sob a planta ornamental *C. citrinus*, o pesquisador Reed Gray realizou alguns testes com amostras de solo para comprovar a atividade alelopática. Após alguns experimentos, descobriu que o composto responsável era a leptospermona (Figura 9A), mas a atividade do composto natural era singela, não adequada para desenvolvimento de um herbicida comercial. Após várias modificações estruturais e testes, a pesquisa chegou ao desenvolvimento da mesotriona (Figura 9B), composto com poder herbicida muito superior ao da substância original e que atendia aos critérios ambientais e de segurança para o desenvolvimento de um produto comercial (KNUDSEN, 2000; MITCHELL et al., 2001; CORNES, 2006).

Figura 9 – Estrutura da leptospermona e da mesotriona



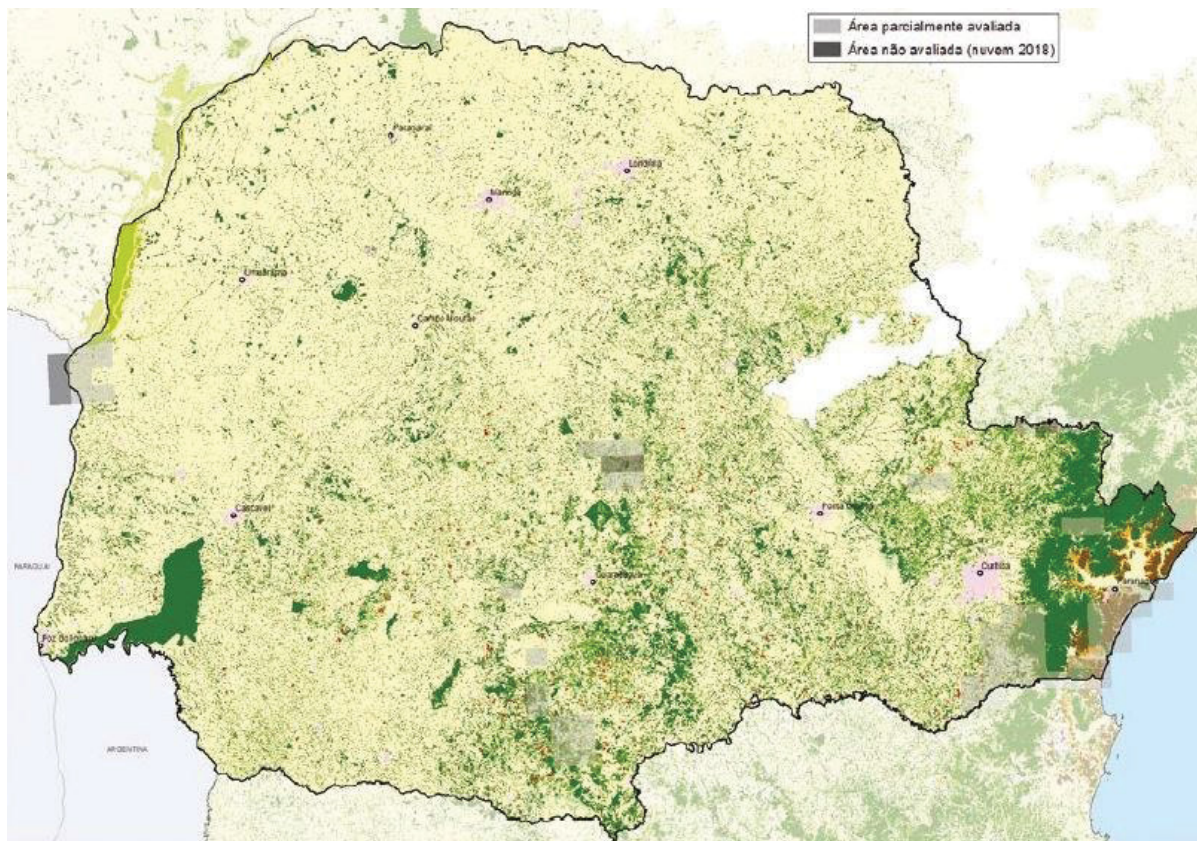
FONTE: A autora (2019).

### 3.3 ESTADO DO PARANÁ: BIODIVERSIDADE

O território do Paraná foi decisivo para a expansão da fronteira agrícola brasileira, mas esse progresso ocorreu com alto custo para fauna e flora dessa região. A Mata Atlântica foi extensivamente devastada, no estado do Paraná apenas 13,1% da área original do bioma encontram-se preservados em pequenos

remanescentes ou áreas protegidas, de acordo com dados da Fundação SOS Mata Atlântica e Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) (2019). A Figura 10 mostra as áreas preservadas no período de 2017 a 2018.

Figura 10 - Remanescentes florestais da Mata Atlântica no estado do Paraná - Período 2017-2018.



FONTE: Fundação SOS Mata Atlântica e Instituto Nacional de Pesquisas Espaciais (INPE) (2019).

Devido ao extensivo desmatamento para ocupação humana, usos agrícolas e exploração de recursos, a Mata Atlântica é considerada um *hotspot* de biodiversidade. *Hotspots* são áreas com grande incidência de espécies endêmicas que apresentam alto grau de degradação. A Mata Atlântica possuía extensão original de mais de 1,2 milhões de km<sup>2</sup>, mas no início do século XXI, as áreas remanescentes somavam somente 7,5 % da área original em pontos isolados e descontínuos. Com o agravante de que apenas pouco mais de um terço dos remanescentes encontra-se em áreas protegidas. O bioma apresenta em torno de 20 mil espécies diferentes de plantas, sendo que 8 mil destas plantas são endêmicas e mais de 1.500 estão ameaçadas de extinção (MYERS et al., 2000;



BOLZANI; FLAUSINO JR; VALLI, 2016; STEHMANN; SOBRAL, 2017; VENEGAS-GONZÁLEZ et al., 2018).

A devastação da Mata Atlântica é um grande problema de ordem ambiental, já que a biodiversidade e o patrimônio genético estão sendo perdidos, acarretando também perda de recursos importantes do ponto de vista farmacêutico e agroquímico (BOLZANI; FLAUSINO JR; VALLI, 2016).

O primeiro produto fitoterápico brasileiro foi desenvolvido a partir de estudos com uma planta nativa da Mata Atlântica. A erva-baleeira (*Cordia verbenacea* DC.) (Figura 11) é um arbusto ereto de 1,5 a 2,5 metros de altura; muito ramificado, apresenta folhas simples e aromáticas, inflorescências terminais com pequenas flores brancas e frutos esféricos contendo as sementes (LORENZI; MATOS, 2008).

Figura 11 – Erva-baleeira



FONTE: FLORA Digital (2019).

As folhas são usadas para o preparo de extratos alcoólicos ou preparo de chás por suas propriedades cicatrizantes, analgésicas, anti-inflamatórias e contra reumatismo (PASSOS et al., 2007) e foram estas propriedades que guiaram as pesquisas. O Acheflan® foi lançado em 2005 como anti-inflamatório de uso tópico produzido com óleo essencial da *C. verbenacea*. O óleo apresenta em sua composição  $\alpha$ -humuleno, responsável pela atividade anti-inflamatória (PASSOS et al., 2007; BOLZANI; FLAUSINO JR; VALLI, 2016). Esse exemplo demonstra o potencial dessa biodiversidade para futuras pesquisas. Além disso, estudos de bioprospecção com a biodiversidade da Mata Atlântica poderiam contribuir para conscientização ambiental e maior abrangência das políticas de preservação.



Diversas plantas nativas da Mata Atlântica já foram objeto de estudos fitoquímicos, farmacológicos ou biológicos, muitas vezes baseados em seus usos na medicina tradicional. Ora-pro-nóbis, erva-mate e pata-de-vaca são aqui destacadas por serem plantas nativas do território paranaense e possuírem diferentes propriedades estudadas.

Ora-pro-nóbis (*Pereskia bleo* H. B. K.; *P. aculeata* Mill. *P. grandifolia* Haw.) (Figura 12) é uma trepadeira ramosa bastante conhecida pelo seu alto conteúdo proteico e poder detoxificante. Na medicina popular, é utilizada para combater inflamações, ácido úrico, anemia, tosse, sífilis, câncer, hemorroidas, problemas estomacais, dores de cabeça e dores musculares, apresentando também propriedades emolientes e anti-hipertensivas (COLETTTO et al., 2010; ZAREISEDEHIZADEH; TAN; KOH, 2014). Estudos já demonstraram suas atividades citotóxica e antiproliferativa (NURESTRI; SIM; NORHANOM, 2009), antioxidante (NURESTRI; NORHANOM; SIM, 2010), analgésica (GUILHON et al., 2015), cicatrizante (PINTO et al., 2016) e anti-inflamatória (PINTO et al., 2015), além de efeito diurético e hipotensivo (KAZAMA et al., 2012).

Figura 12 – Ora-pro-nóbis



FONTE: FLORA Digital (2019).

A erva-mate (*Ilex paraguariensis* A. St.-Hil.) (Figura 13) é uma árvore de copa densa com folhas verde escuras que são usadas para preparar o chimarrão, bebida quente muito comum no Rio Grande do Sul e em alguns países da América do Sul (LORENZI, 2008). A infusão das folhas da erva mate já era usada como estimulante pelos índios da América do Sul antes da chegada dos europeus

(BRANDÃO, 2017). Esta planta medicinal é muito difundida por seu efeito tônico e estimulante, reduzindo fadiga mental e física, é diurética, melhora a digestão e o apetite; as folhas também podem ser usadas externamente para o tratamento de problemas de pele (LORENZI; MATOS, 2008; COLETTTO et al., 2010; FINTELMANN; WEISS, 2010). Entre os benefícios comprovados estão: efeito anti-diabético (de LIMA et al., 2018), anti-obesidade (KIM et al., 2015), efeito cardioprotetivo (SCHINELLA; FANTINELLI; MOSCA, 2005) e neuroprotetivo (BRANCO et al., 2013), atividades citotóxica, antiproliferativa (AMIGO-BENAVENT et al., 2017), anti-inflamatória (LUZ et al., 2016) e antibacteriana (KUNDEL et al., 2018).

Figura 13 – Erva-mate



FONTE: FLORA Digital (2019).

A pata-de-vaca (*Bauhinia forficata* Link) é assim chamada pois suas folhas possuem uma divisão central, deixando-as com aspecto semelhante às patas de bovinos (Figura 14) (LORENZI, 2008). Na medicina tradicional, a planta é tida como hipoglicemiante, utilizada para redução da glicose sanguínea (LORENZI; MATOS, 2008), propriedade que já foi comprovada (MENEZES et al., 2007; da CUNHA et al., 2010; CURCIO et al., 2012; ECKER et al., 2017). Além disso, apresenta propriedades diuréticas, o que a torna benéfica contra cálculos renais, além das propriedades antimicrobianas, analgésicas e anti-inflamatórias; também é empregada no tratamento de diarreia, cistite, elefantíase e parasitas intestinais (LORENZI; MATOS, 2008; COLETTTO et al., 2010; GRANDI, 2014). Há trabalhos afirmando seu uso medicinal como antioxidante (SALGUEIRO et al., 2016),

antibacteriana (PEREIRA et al., 2014), antifúngica (ALVES et al., 2017) e contra câncer (DÜSMAN et al., 2013).

Figura 14 – Pata-de-vaca



FONTE: FLORA Digital (2019).

As três espécies destacadas demonstram o potencial da biodiversidade da região Oeste do Paraná, uma vez que suas propriedades foram estudadas e confirmadas. Outras plantas, porém, ainda não puderam demonstrar sua composição química e atividades biológicas, devido aos poucos estudos realizados. Um exemplo dessas plantas é o cedro, planta que foi objeto deste trabalho.

### 3.4 GÊNERO *Cedrela*

O gênero *Cedrela* P. Browne distribui-se ao longo das Américas Central e do Sul, compreende em torno de 17 diferentes espécies encontradas principalmente em florestas tropicais (MUELLNER et al., 2010; de LEO et al., 2018). O enquadramento taxonômico do gênero encontra-se no Quadro 1.

Quadro 1 – Enquadramento taxonômico do gênero *Cedrela*

Classe	Equisetopsida C. Agardh
Subclasse	Magnoliidae Novák ex Takht.
Ordem	Sapindales Juss. ex Bercht. & J. Presl
Família	Meliaceae Juss

Fonte: TROPICOS (2019).

Dentre a literatura consultada sobre o gênero, trabalhos com a espécie *Cedrela odorata* L. foram os mais frequentes. Esta espécie é bastante valorizada pela sua madeira (MUELLNER et al., 2010), mas também pelo seu uso na medicina tradicional, já que sua casca é usada contra febre, reumatismo e malária, além de ser adstringente e vermífuga (LORENZI, 2008). A atividade do extrato da casca contra o plasmódio causador da malária foi comprovada (MACKINNON et al., 1997; de MADUREIRA et al., 2002). Ainda, Mackinnon e outros (1997) demonstraram que a gedunina isolada das cascas teve significativa atividade antimalárica.

O óleo volátil das cascas, composto principalmente por sesquiterpenos, mostrou atividade contra a bactéria *Bacillus cereus* e contra o fungo *Aspergillus niger*.  $\beta$ -elemeno e germacrene D foram as substâncias encontradas em maior concentração no óleo (VILLANUEVA et al., 2009). As cascas também demonstraram atividade contra *Streptococcus mutans* e extratos das sementes foram efetivos contra *S. mutans* e contra *Porphyromonas gingivalis*, bactérias causadoras de problemas bucais (ROSAS-PIÑÓN et al., 2012).

Extratos de *C. odorata* apresentaram atividade antioxidante (RASHED, 2014; ALMONTE-FLORES et al., 2015) e efeitos positivos sobre diabetes. Giordani et al. (2015) demonstraram atividade de redução dos picos de glicose sanguínea *in vitro* e *in vivo* do extrato hidroetanólico das cascas do caule. Em ratos diabéticos, o extrato teve efeito benéfico sobre o metabolismo antioxidante, reduzindo o dano oxidativo associado ao diabetes e à hiperglicemia. Os autores identificaram no extrato os compostos fenólicos ácido gálico, (-)-galocatequina e (+)-catequina.

Corroborando com estes resultados, Almonte-Flores e colaboradores (2015) relataram efeito hipoglicêmico das cascas, associado a redução da peroxidação de lipídeos no fígado em ratos diabéticos. Por fim, os cedrodorols A e B, isolados de galhos e folhas, manifestaram atividade inibitória da proteína tirosina fosfatase 1B,



que é um importante alvo terapêutico para distúrbios metabólicos, incluindo diabetes (WU et al., 2014).

As preparações com a espécie *Cedrela toona* Roxb. ex Rottler & Willd são usadas contra febre, diabetes, desinteria, infecções de pele, na cicatrização de feridas e úlceras (KHAN et al., 2014). Alguns destes usos podem estar relacionados à atividade antimicrobiana dos extratos. As folhas da planta inibiram o crescimento de *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* (KHAN et al., 2014) e *Neisseria gonorrhoeae* (SHOKEEN; BALA; TANDON, 2009). O extrato metanólico da madeira de *C. toona*, juntamente com o extrato da madeira de *C. serrata*, demonstrou potente atividade contra o protozoário causador da leishmaniose (TAKAHASHI et al., 2004).

As cascas e folhas de *Cedrela serrata* Royle se mostraram ativas contra *Plasmodium falciparum* (malária), *Trypanosoma cruzi* (doença de Chagas), *Leishmania infantum* (leishmaniose) e *Trypanosoma brucei* (doença do sono) (AHMAD et al., 2016). Alguns destes patógenos foram inibidos por outras espécies do gênero, o que é um indício de grupos de moléculas semelhantes entre elas.

As cascas e folhas de *C. serrata* também demonstraram atividade antioxidante, o que pode ter relação com o uso tradicional da planta contra doenças do fígado (AHMAD et al., 2016). A medicina tradicional também indica o uso de *C. serrata* para tratar infecções. Nesse sentido, as folhas e cascas demonstraram atividade contra as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* e *B. subtilis* e contra as Gram-negativas *Proteus mirabilis*, *Salmonella typhi*, *E. coli* e *Citrobacter* spp. (AHMAD et al., 2013). A casca também possui atividade contra a levedura *Candida albicans* (AHMAD et al., 2016).

Ainda se tratando de atividade antimicrobiana, a fração polissacarídica obtida das folhas de *Cedrela tubiflora* Bertoni foi capaz de inibir a replicação de dois vírus patógenos humanos, o herpes-vírus humano tipo 2 e o vírus da estomatite vesicular (CRAIG; BENENCIA; COULOMBIÉ, 2001). As folhas de *C. tubiflora* também demonstraram efeito imunomodulatório, reduzindo componentes associados à inflamação (BENENCIA et al., 1995). Esse efeito também foi observado para as folhas de outra espécie: *Cedrela lilloi* C. DC. (NORES et al., 1997).

As folhas de *Cedrela sinensis* A. Juss. tiveram atividade anti-inflamatória comprovada (BAK et al., 2009), além da atividade antioxidante de alguns compostos

isolados das folhas: quercitrina (BAK et al., 2011),  $\alpha$ -tocopherol, escopoletina, luteína e metil-galato (HWANG et al., 2005). Os últimos quatro compostos também exibiram atividade inibitória da tirosinase, enzima que tem papel importante na formação de melanina, o que torna esses compostos de interesse da indústria cosmética e farmacêutica, pelo potencial como clareadores de manchas de pele (HWANG et al., 2005; CHANG, 2009). O óleo essencial das sementes inibiu os microrganismos *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, sendo o principal constituinte o terpeno 1,6-ciclododecadieno (LIN et al., 2012).

Algumas das plantas do gênero também tiveram seus extratos testados em busca de atividades de interesse agrícola, como atividade alelopática e inseticida. O extrato de *C. odorata* inibiu a germinação de milho e feijão, o que demonstra que há compostos presentes no extrato com potencial herbicida de amplo espectro, contra monocotiledôneas e dicotiledôneas (DOMÍNGUEZ; ALCORN, 1985).

Compostos extraídos da madeira de *Cedrela ciliolata* S.F. Blake se mostraram bons inibidores de crescimento das espécies *Lolium multiflorum* Lam., *Trifolium alexandrinum* L., *Physalis ixocarpa* Brot. ex Hornem, *Triticum vulgar* L. A aplicação reduziu a germinação das sementes e o crescimento das plantas germinadas (CÉSPEDES et al., 1999). Da mesma forma, o cedrelanolide, isolado a partir das cascas de *C. salvadorensis*, inibiu a germinação, respiração das sementes e peso seco das plântulas germinadas de *L. multiflorum* var. *Hercules*, *T. vulgare* var. *Salamanca*, *P. ixocarpa* e *T. alexandrinum* (CÉSPEDES et al., 2001). Além disso, cedrelanolide (também isolado de *C. salvadorensis*) demonstrou atividade inseticida contra a broca de milho europeia (*Ostrinia nubilalis*), inseto que pode causar grandes perdas de produtividade em culturas de milho (JIMENEZ et al., 1997). Este mesmo composto, juntamente com outros três (epímeros de fotogedunina, acetato de fotogedunina e gedunina), isolados a partir da madeira de *Cedrela dugesii* S. Watson e *C. salvadorensis*, se mostraram inseticidas contra *Spodoptera frugiperda* (lagarta-do-cartucho), com resultados comparáveis ao inseticida comercial (CÉSPEDES et al., 2000).

### 3.5 CEDRO

O cedro (*Cedrela fissilis* Vell.) é uma espécie arbórea decídua da família Meliaceae, também conhecida como cedro-rosa, cedro-vermelho, cedro-branco ou

cedro-batata (COLETTTO et al., 2010). É nativa do Brasil, comumente encontrada no território paranaense, mas ocorre desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul, é empregada em paisagismos e reflorestamentos e sua madeira é apreciada para diversas finalidades, por sua qualidade e durabilidade (LORENZI, 2008). É uma espécie que ocorre em planícies e distribui-se entre diferentes formações vegetais, desde florestas até o cerrado (MUELLNER et al., 2010). De acordo com Lorenzi (2008, p. 266), as principais características do cedro são:

Altura de 8-35m, com tronco de 60-90 cm de diâmetro, revestido por casca com ritidoma suberoso. Folhas alternadas espiraladas, compostas pinadas, de 60-100 cm de comprimento; folíolos opostos a subopostos, oblongo-lanceolados a oval-lanceolados, com a face abaxial pilosa, hirsuta ou tomentosa, de 8-18 cm de comprimento. Fruto cápsula septífraga deiscente, com sementes monoaladas.

Os frutos lenhosos amadurecem entre julho e agosto, momento em que a árvore se encontra sem folhas e a florescência ocorre entre agosto e setembro. As flores unissexuadas são dispostas em inflorescências laterais (COLETTTO et al., 2010). As características da planta podem ser observadas nas Figuras 15 e 16.

Figura 15 – Cedro



FONTE: ENCYCLOPEDIA of Life (2019).



Figura 16 – Folhas, frutos e flores do cedro



FONTE: FLORA Digital (2019); ENCYCLOPEDIA of Life (2019).

Suas folhas e cascas são utilizadas na medicina tradicional na forma de infusões e decocções contra problemas de pele, olhos, ouvidos, nariz e garganta, principalmente inflamações, problemas do sistema respiratório e problemas do sistema endócrino (BOLSON et al., 2015). Sua casca é considerada “antitérmica, emética, antileucorreica e usada para secagem de úlceras.” (COLETTTO et al., 2010, p. 61). A casca também é utilizada para tratar infecção urinária, malária, infecções bacterianas e diarreia (BOTSARIS, 2007; NUNES et al., 2007).

O fissinólido foi o primeiro limonoide identificado nesta espécie, foi isolado e caracterizado por Zelnik e Rosito (1966) a partir dos frutos. Os limonoides são um grupo de triterpenos, responsável pelo sabor amargo de algumas frutas (TAIZ; ZEIGER, 2009). Limonoides, juntamente com os triterpenos, duas classes de terpenos, são os metabólitos mais abundantes no gênero *Cedrela*, encontrados em uma grande diversidade de estruturas (de LEO et al., 2018). Da mesma forma, a maior parte dos compostos identificados na espécie *C. fissilis* são terpenos, como demonstrado na Tabela 1.



Tabela 1 – Compostos presentes no cedro

(continua)			
Classe de compostos	Composto	Parte da planta	Referência
Limonoides	Fissinólide	Frutos	Zelnik e Rosito (1966)
	3 $\beta$ -acetoxicarapina	Raízes	Leite et al. (2005); Leite et al. (2008)
	Gedunina	Raízes	Ambrozin et al. (2006); Leite et al. (2008)
	6 $\alpha$ -acetoxigedunina	Raízes	Ambrozin et al. (2006)
	7-deacetilgedunina	Folhas	Ambrozin et al. (2006)
	Fotogedunina	Folhas	Ambrozin et al. (2006); Leite et al. (2008)
	7-deacetoxi-7-oxogedunina	Folhas	Ambrozin et al. (2006); Leite et al. (2008)
	1,2-dihidro-3 $\beta$ -hidroxi-7-deacetoxi-7-oxogedunina	Folhas	Ambrozin et al. (2006)
	Metil angolensato	Folhas	Leite et al. (2008)
	20,21,22,23-tetrahidro-23-oxoazadirona	Folhas	Leite et al. (2008)
Triterpenos	Ácido oleanólico	Raízes	Leite et al. (2005)
		Frutos	Leite et al. (2008)
	Ácido oleanônico	Raízes	Leite et al. (2005)
		Frutos	Leite et al. (2008)
	Hispidol A	Pecíolos	Leite et al. (2008)
	Piscidinol A	Pecíolos	Leite et al. (2008)
	Pentaol	Pecíolos	Leite et al. (2008)
	Nilocetina	Raízes	Leite et al. (2008)
	Odoratól	Pecíolos	Leite et al. (2008)
	Iso-odoratól	Pecíolos	Leite et al. (2008)
	Odoratone	Pecíolos	Leite et al. (2008)
	22S,3 $\alpha$ -dihidotirucala-7,24-dien-23-ona	Pecíolos	Leite et al. (2008)
	Ácido 3,11-dioxoolean-12-en-28-onico	Frutos	Leite et al. (2008)
	24-metileno-26-hidroxicicloartan-3-ona	Raízes	Leite et al. (2008)
Sequiterpenos	$\beta$ -longipineno	Folhas	Maia et al. (2000)
	Cis-4(14),5-muroladieno	Folhas	Maia et al. (2000)
	Epizonareno	Folhas	Maia et al. (2000)

Tabela 1 – Compostos presentes no cedro

			(continuação)
Classe de compostos	Composto	Parte da planta	Referência
Sequiterpenos	$\alpha$ -copaeno	Folhas	Lago et al. (2004)
		Cascas do caule	Lago et al. (2004)
	$\beta$ -elemeno	Folhas	Lago et al. (2004)
		Cascas do caule	Lago et al. (2004)
	$\beta$ -cariofileno	Folhas	Lago et al. (2004)
		Cascas do caule	Lago et al. (2004)
	Aromadendreno	Folhas	Lago et al. (2004)
		Cascas do caule	Lago et al. (2004)
	$\alpha$ -humuleno	Folhas	Maia et al. (2000); Lago et al. (2004)
		Cascas do caule	Lago et al. (2004)
	Germacreno D	Folhas	Lago et al. (2004)
		Cascas do caule	Lago et al. (2004)
	$\beta$ -selineno	Folhas	Lago et al. (2004)
		Cascas do caule	Lago et al. (2004)
	Biciclogermacreno	Folhas	Maia et al. (2000); Lago et al. (2004)
		Cascas do caule	Lago et al. (2004)
	Germacreno A	Folhas	Lago et al. (2004)
		Cascas do caule	Lago et al. (2004)
	$\beta$ -bisaboleno	Folhas	Lago et al. (2004)
		Cascas do caule	Lago et al. (2004)
	$\delta$ -cadineno	Folhas	Lago et al. (2004)
		Cascas do caule	Lago et al. (2004)
	(E)-nerolidol	Folhas	Lago et al. (2004)
	Spatulenol	Folhas	Lago et al. (2004)
		Cascas do caule	Lago et al. (2004)
	Óxido de cariofileno	Folhas	Lago et al. (2004)
		Cascas do caule	Lago et al. (2004)
	Globulol	Folhas	Lago et al. (2004)
		Cascas do caule	Lago et al. (2004)
	Viridiflorol	Folhas	Lago et al. (2004)
		Cascas do caule	Lago et al. (2004)
	$\tau$ -muurolol	Folhas	Lago et al. (2004)
		Cascas do caule	Lago et al. (2004)
	$\alpha$ -cubebeno	Cascas do caule	Lago et al. (2004)
		Folhas	Maia et al. (2000)
	$\beta$ - cubebeno	Folhas	Maia et al. (2000)

Tabela 1 – Compostos presentes no cedro

			(conclusão)
Classe de compostos	Composto	Parte da planta	Referência
Sequiterpenos	$\beta$ -santalene	Cascas do caule	Lago et al. (2004)
	$\alpha$ -muurolene	Cascas do caule	Lago et al. (2004)
	Ledol	Cascas do caule	Lago et al. (2004)
	$\beta$ -eudesmol	Cascas do caule	Lago et al. (2004)
	$\alpha$ -eudesmol	Cascas do caule	Lago et al. (2004)
	$\tau$ -cadinol	Cascas do caule	Lago et al. (2004)
	$\alpha$ -cadinol	Cascas do caule	Lago et al. (2004)
	(E,E)-farnesol	Cascas do caule	Lago et al. (2004)
	Criptomeridiol	Raízes	Leite et al. (2008)
Flavonoide	<i>ent</i> -catequina	Frutos	Leite et al. (2008)
Esteroides	$\beta$ -sitosterol	Caule	Cortez et al. (1998)
		n.d.	Leite et al. (2008)
	Stigmasterol	n.d.	Leite et al. (2008)
		Caule	Cortez et al. (1998)
	Campesterol	n.d.	Leite et al. (2008)
		Caule	Cortez et al. (1998)
	Sitostenone	n.d	Leite et al. (2008)
	3 $\beta$ -O- $\beta$ -D-glucopiranosil-sitosterol;	n.d.	Leite et al. (2008)

FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: n.d. não descrito.

Além da composição química, também foram realizados alguns estudos sobre as atividades biológicas da espécie *C. fissilis*. O extrato hexânico do caule apresentou atividade contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus*, que foi relacionado pelos autores a uma mistura dos esteroides campesterol, estigmasterol e sitosterol presentes no extrato (CORTEZ et al., 1998). O extrato hidroetanólico das cascas manifestou atividade contra *E. coli*, *S. aureus* e *B. cereus* (CARMINATE et al., 2014). O óleo volátil das folhas também apresentou atividade antimicrobiana contra *S. aureus* e *E. coli*, sendo que os principais compostos identificados neste óleo foram  $\beta$ -cariofileno e biciclogermacreno (LAGO et al., 2004). Também foi verificada a atividade antinociceptiva do extrato metanólico das cascas. O extrato bruto foi capaz de reduzir significativamente as contorções abdominais em camundongos e, após o particionamento, a fração diclorometano demonstrou os resultados mais expressivos (NASCIMENTO, 2016).

Leite e colaboradores (2008) testaram diversos extratos preparados a partir de diferentes partes do cedro em busca de atividade contra o protozoário *T. cruzi*, causador da doença de Chagas, enfermidade que ainda afeta milhares de pessoas nas Américas Central e do Sul. Onze dos extratos testados demonstraram atividade: frutos (extratos em hexano, diclorometano e metanol), ramos (extratos em hexano e diclorometano), pecíolos (hexano, diclorometano e metanol), folhas (hexano e diclorometano), além do extrato das raízes em diclorometano, que foi capaz de reduzir o número de parasitas em 97,4 %, sendo o mais ativo entre os extratos testados. Dentre os compostos isolados a partir dos extratos, os compostos odoratol, iso-odoratol, odoratona e pentaol demonstraram atividades semelhantes e até maiores que o controle positivo empregado no teste.

Além dos trabalhos com foco em problemas de saúde, estudos avaliaram a atividade inseticida de substâncias presentes na espécie. Os compostos 3 $\beta$ -acetoxicarapina, ácido oleanólico e ácido oleanônico, isolados das raízes do cedro, reduziram a taxa de sobrevivência de formigas cortadeiras *Atta sexdens rubropilosa* (LEITE et al., 2005). Além disso, também foram tóxicos para estes insetos os limonoides gedunina e 6 $\alpha$ -acetoxigedunina, isolados das raízes, e os limonoides 7-deacetilgedunina, fotogedunina, 7-deacetoxi-7-oxogedunina e 1,2-dihidro-3 $\beta$ -hidroxi-7-deacetoxi-7-oxogedunina, extraídos das folhas (AMBROZIN et al., 2006).

Os triterpenos ácido oleanólico, ácido oleanônico e odoratol isolados da espécie *C. fissilis* demonstraram atividade antialimentar e inibidora do crescimento de larvas de *S. frugiperda* (lagarta do cartucho), além disso, o odoratol causou significativa morte das larvas (MATOS, 2006). Diferentes extratos brutos de folhas, galhos, raízes, caule e frutos do cedro também foram testados contra a lagarta do cartucho. Além de alguns extratos com atividades menores, o extrato das folhas em diclorometano demonstrou uma potente atividade inseticida (MATOS et al., 2010).

Diante dos estudos relatados, pode-se verificar que o cedro é uma espécie que se encontra pouco caracterizada e testada quanto às suas propriedades, apesar de ter apresentado resultados promissores em diferentes testes e ter demonstrado ser fonte de uma diversidade de substâncias, principalmente terpenos.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 REAGENTES E EQUIPAMENTOS

Os solventes hexano e acetato de etila foram obtidos da Alphatec®; acetona da Êxodo Científica®; etanol, DMSO (dimetilsulfóxido), ácido ascórbico e iodo da Synth®; carbonato de sódio da CRQ Química®; o reagente de Folin-Ciocalteu da Dinâmica®, cloreto de alumínio heptahidratado da Vetec®, ácido sulfúrico da Impex™. O DPPH e as cromatoplasas para cromatografia em camada delgada foram adquiridos da Sigma-Aldrich™.

O cloreto de azul de nitrotetrazólio foi obtido de Invitrogen Molecular Probes™. Os meios de cultivo BHI (*Brain Heart Infusion*) e MH (Müller-Hinton) foram comprados de Himedia® e Prodimol Biotecnologia®, respectivamente. O antibiótico gentamicina utilizado foi Gentatec® (Chemitec) e o antimicótico nistatina Micostalab® (Multilab). Ácido gálico e quercetina foram comprados em farmácia de manipulação local.

Os equipamentos utilizados foram moinho de facas Star FT 48 (Fortinox®), espectrofotômetro Type Helius Aquamate (Thermo Electron Corporation™), estufa bacteriológica Lucadema® e estufa de crescimento vegetal EL202/4 (EletroLab®).

### 4.2 COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL

O material vegetal foi coletado de uma planta de cedro (*Cedrela fissilis* Vell.) adulta na cidade de Guaíra (PR), latitude -24.184487(S), longitude -054.207869(O), em março de 2018. Uma exsicata do espécime foi depositada no Herbário do Campus Palotina (HCP) da Universidade Federal do Paraná, sob o n. 1377. Além disso, o projeto de pesquisa encontra-se cadastrado na plataforma SISGEN (Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado) pelo código ABFF9CA.

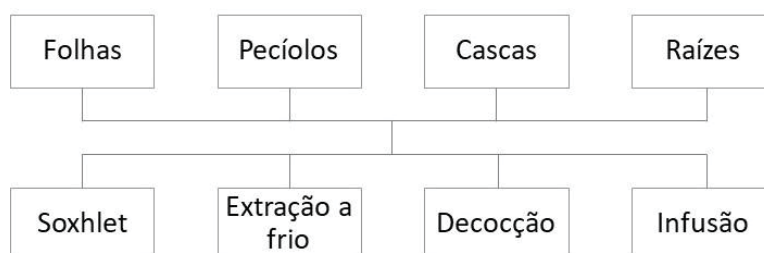
Foram coletadas amostras de folhas, pecíolos, cascas do caule e raízes. As amostras foram lavadas e secas em estufa com circulação de ar a 70 °C por 48 horas para folhas, pecíolos e cascas; por 72 horas para raízes. Após a secagem, o material foi triturado em moinho de facas com peneira de 2 mm. O material foi

armazenado em local seco e protegido da luz para prevenir ataques de microrganismos e degradação.

### 4.3 EXTRAÇÕES

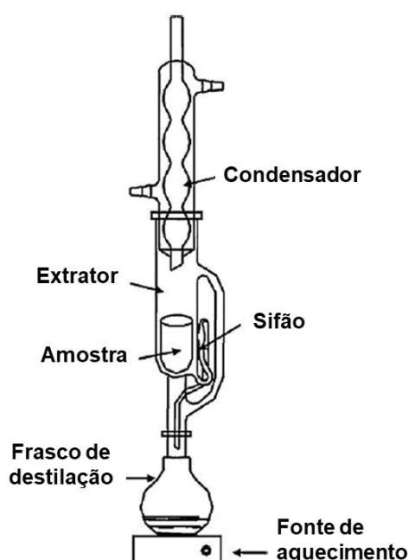
Foram utilizadas diferentes metodologias para extração do material vegetal, utilizando água como solvente de extração ou solventes orgânicos, conforme demonstrado no Quadro 2. As extrações orgânicas foram realizadas pela metodologia de Soxhlet (Figura 17) com os solventes hexano, acetato de etila, acetona e etanol. Algumas propriedades destes solventes podem ser encontradas na Tabela 2. As quantidades de material seco utilizadas para estas extrações foram 153,03 g para folhas; 81,60 g para pecíolos; 120,60 g para cascas e 124,07 g para raízes.

Quadro 2 – Metodologias para extração do material vegetal do cedro



FONTE: A autora (2019).

Figura 17 – Extrator de Soxhlet



FONTE: Adaptado de de CASTRO; PRIEGO-CAPOTE, 2010.

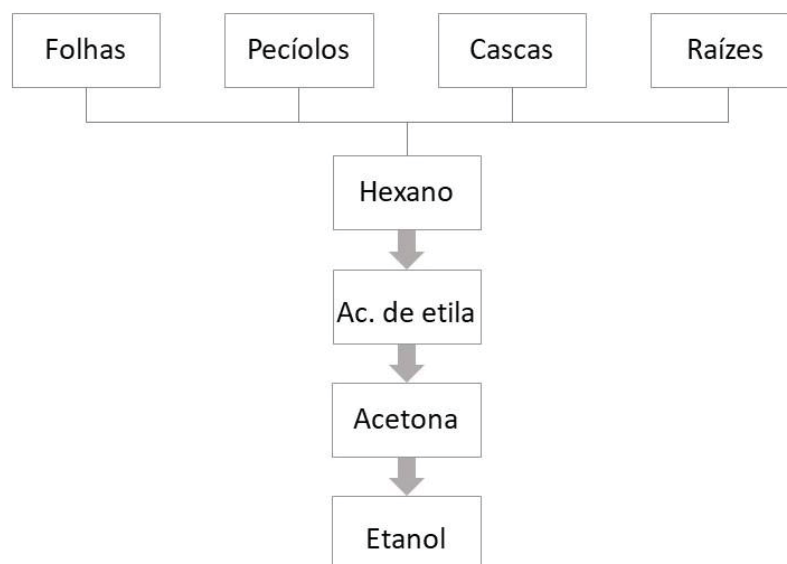
Tabela 2 – Propriedades dos solventes utilizados nas extrações

<b>Solvente</b>	<b>Ponto de ebulição (°C)</b>	<b>Polaridade relativa</b>	<b>Força de eluição</b>
Hexano	69,0	0,009	0,01
Acetato de etila	77,0	0,228	0,57
Acetona	56,2	0,355	0,56
Etanol	78,5	0,654	0,88
Água	100,0	1,000	>>1

FONTE: Adaptado de SOLVENT Polarity Table - Miller's Home (2019).

Para promover uma separação prévia dos componentes, foi realizada extração sequencial por Soxhlet (SAJEESH; ARUNACHALAM; PARIMELAZHAGAN, 2011) com os quatro solventes por gradiente de polaridade, do mais apolar para o mais polar (Quadro 3). Buscou-se uma extração exaustiva do material, dessa forma, determinou-se o tempo de 4 horas para cada solvente. Durante esse tempo, o equipamento foi mantido na temperatura de ebulição do solvente utilizado. Ao fim da extração, o solvente foi evaporado, o resíduo foi pesado e congelado até a realização das análises. A massa do resíduo foi utilizada como base para o cálculo do rendimento das extrações.

Quadro 3 – Extração sequencial em aparato de Soxhlet



FONTE: A autora (2019).

Em paralelo às extrações orgânicas, foram realizadas extrações aquosas de três formas diferentes: por maceração (extração a frio), por infusão e por decocção. Algumas propriedades importantes da água encontram-se na Tabela 1. As decocções foram preparadas de acordo com Ordoñez et al. (2006): 5 g de amostra

foram fervidos com 80 mL de água destilada por 20 minutos, as soluções foram filtradas ainda quentes e, após o resfriamento, o volume completado com água destilada qsp (quantidade suficiente para) 100 mL. Para facilitar a comparação entre as extrações, a massa de amostra e o volume final da solução foram padronizados para as outras extrações aquosas. Para a infusão, água destilada foi aquecida ao ponto de fervura e então vertida sobre as amostras. As infusões foram deixadas em repouso por 20 minutos e, em seguida, filtradas e o volume da solução completado. Já na extração por maceração estática, as amostras foram deixadas em repouso com água destilada à temperatura ambiente e ao abrigo da luz por 48 horas. Foram então filtradas e o volume final completado com água destilada. Todas as soluções foram congeladas até o uso para as análises. O material retido no filtro foi seco em estufa, pesado e utilizado para o cálculo do rendimento, de acordo com a equação:

$$AQ = 100 - \left[ \frac{(m_f - m_i)}{m_a} \times 100 \right]$$

onde:

AQ = Rendimento das extrações aquosas;

$m_f$  = Massa do filtro com material retido após secagem;

$m_i$  = Massa inicial do filtro;

$m_a$  = Massa de amostra utilizada.

#### 4.4 CARACTERIZAÇÃO DOS EXTRATOS

Foram realizados testes de conteúdo de compostos fenólicos, conteúdo de flavonoides e avaliação de atividade antioxidante com todos os extratos para a caracterização do perfil das moléculas presentes nos extratos. Para os extratos aquosos, uma alíquota da amostra foi pipetada diretamente das soluções descritas no item 4.3. Realizou-se uma varredura em espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 200 a 800 nm, com extratos aquosos diluídos em água destilada na proporção de 1:200.

Os extratos orgânicos foram diluídos em metanol, conforme demonstrado na Tabela 3. Estas soluções foram utilizadas para as análises de conteúdo de



compostos fenólicos, conteúdo de flavonoides e para varredura em espectrofotômetro (200 a 800 nm).

Tabela 3 – Soluções amostra dos extratos orgânicos do cedro para caracterização

Parte da planta	Extrato	Massa (mg)	Concentração (ppm)
Folhas	Hexano	2,5	50
	Acetato de etila	2,6	52
	Acetona	2,7	54
	Etanol	2,4	48
Pecíolos	Hexano	2,4	48
	Acetato de etila	2,5	50
	Acetona	2,5	50
	Etanol	2,5	50
Casca	Hexano	2,6	52
	Acetato de etila	2,3	46
	Acetona	2,7	54
	Etanol	2,4	48
Raízes	Hexano	2,4	48
	Acetato de etila	2,8	56
	Acetona	2,7	54
	Etanol	2,5	50

FONTE: A autora (2019).

#### 4.4.1 Conteúdo de compostos fenólicos

A metodologia proposta por Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós (1999), com algumas adaptações, foi utilizada neste trabalho para determinação do conteúdo de compostos fenólicos. Para os extratos aquosos, as soluções amostra, branco e da curva analítica foram preparados da seguinte forma: 0,1 mL de amostra ou padrão (ácido gálico em diferentes concentrações); 2,4 mL de água destilada; 1,0 mL de carbonato de sódio 5% (m/v) e 0,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu.

As amostras, brancos e curva foram deixados em repouso por 60 minutos ao abrigo da luz e então lidos em espectrofotômetro no comprimento de onda de 720 nm. O branco foi usado para desconsiderar possíveis absorbâncias dos solventes e reagentes utilizados. A concentração de fenóis nas amostras foi determinada através da comparação com a curva padrão de ácido gálico, preparada nas concentrações: 10 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm e 500 ppm. Todos os pontos das curvas, as amostras e os brancos foram preparados em triplicata e os resultados foram expressos em  $\mu\text{g}$  equivalentes de ácido gálico por g de extrato seco ( $\mu\text{g}$  EAG/g).

Devido a problemas de solubilidade, houve necessidade de adequação da metodologia do teste para a análise dos extratos orgânicos. As amostras, branco e curva foram preparados com 1,4 mL de acetona; 1,4 mL de água destilada; 0,1 mL de padrão ou amostra; 1,0 mL de carbonato de sódio 5% (m/v) e 0,1 mL de reagente de Folin-Ciocalteu;

A curva analítica para os extratos orgânicos foi preparada nas seguintes concentrações: 10 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 300 ppm, 500 ppm, 800 ppm e 1000 ppm. O tempo de repouso, a leitura e o cálculo da concentração das amostras foram realizados conforme descrito para os extratos aquosos.

#### 4.4.2 Conteúdo total de flavonoides

O teste de conteúdo total de flavonoides foi adaptado da metodologia proposta por Chang et al. (2002). Para os extratos aquosos, foram usados 100 µL de solução amostra, 900 µL de diluente metanol:água destilada (11:9) e 2 mL de cloreto de alumínio heptahidratado ( $\text{AlCl}_3 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ) a 5% (m/v). As amostras foram mantidas por 60 minutos em repouso protegidas da luz e sua absorbância foi medida em espectrofotômetro no comprimento de onda de 425 nm. A concentração de flavonoides das amostras foi calculada através da comparação com curva analítica de quercetina diluída em metanol:água (1:1) para que a proporção de metanol na solução final fosse mantida. Os pontos da curva de calibração foram preparados nas seguintes concentrações: 10 ppm, 50 ppm, 100 ppm, 200 ppm, 300 ppm, 400 ppm e 500 ppm.

Para os extratos orgânicos, a curva padrão foi preparada em metanol puro e o diluente utilizado para a curva e as amostras também foi metanol. Esta modificação foi feita para evitar problemas de precipitação de compostos. O restante da metodologia ocorreu da mesma forma.

Concomitantemente, foram preparados brancos para desconsiderar a absorbância dos solventes e reagentes utilizados. Todos os pontos das curvas, as amostras e os brancos foram preparados em triplicata e os resultados foram expressos em µg equivalentes de quercetina por g de extrato seco (µg EQ/g).

#### 4.4.3 Atividade antioxidante

A análise de atividade antioxidante foi realizada de acordo com Amira e colaboradores (2012), com algumas alterações. A reação para os extratos aquosos foi preparada da seguinte forma: 1 mL de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) 0,1 mM em metanol; 2 mL de metanol e 50 µL de solução amostra.

Para a análise da atividade dos extratos orgânicos, o DPPH e o metanol foram adicionados da mesma forma, mas foram adicionados 500 µL de solução amostra, para melhorar a detecção da atividade antioxidante destes extratos. As soluções amostras utilizadas foram preparadas com cada extrato sendo diluído no mesmo solvente que foi utilizado para sua extração, para reduzir problemas de solubilidade, como descrito na Tabela 4.

Tabela 4 – Soluções amostra dos extratos orgânicos do cedro para teste de atividade antioxidante

Parte da planta	Extrato	Massa (mg)	Diluente	Concentração (ppm)
Folhas	Hexano	2,7	Hexano	54
	Acetato de etila	2,5	Acetato de etila	50
	Acetona	2,5	Acetona	50
	Etanol	2,7	Etanol	54
Pecíolos	Hexano	2,5	Hexano	50
	Acetato de etila	2,7	Acetato de etila	54
	Acetona	2,5	Acetona	50
	Etanol	2,7	Etanol	54
Casca	Hexano	2,5	Hexano	50
	Acetato de etila	2,8	Acetato de etila	56
	Acetona	2,5	Acetona	50
	Etanol	2,3	Etanol	46
Raízes	Hexano	2,5	Hexano	50
	Acetato de etila	2,5	Acetato de etila	50
	Acetona	2,7	Acetona	54
	Etanol	2,7	Etanol	54

FONTE: A autora (2019).

Foram preparadas soluções branco para cada solvente utilizado na diluição das amostras, além do branco com água destilada, para os extratos aquosos. Os brancos e as amostras foram preparados em triplicata, mantidos por 30 minutos em repouso e lidos a 517 nm. A atividade antioxidante foi calculada através do percentual do radical DPPH neutralizado pelas amostras, usando a equação:

$$AA = \frac{(Abs_B - Abs_A)}{Abs_B} \times 100$$

onde:

AA = atividade antioxidante;

Abs<sub>B</sub> = Absorbância da solução branco;

Abs<sub>A</sub> = Absorbância das soluções amostra.

Para efeito de comparação, avaliou-se a atividade antioxidante do ácido ascórbico, sob a mesma metodologia, nas seguintes concentrações: 10 ppm; 50 ppm; 100 ppm; 500 ppm; 1000 ppm. Todo teste foi preparado em triplicata.

#### 4.4.4 Caracterização por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

Com o intuito de realizar um *screening* dos grupos de moléculas presentes nos extratos, foi realizada cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando-se diferentes métodos de revelação. Para caracterização dos extratos orgânicos, foram pesados em torno de 10 mg de cada um dos extratos, que foram dissolvidos em 100 µL do solvente utilizado para a extração. Foram usadas cromatoplasas comerciais de sílica gel com indicador fluorescente e tamanho médio de poro 60 Å, com 5 cm de largura e 7 cm de altura. Os extratos foram aplicados com auxílio de capilar de vidro a 1 cm das bordas da placa e com 1 cm entre os *spots* (pontos) de aplicação. Os extratos aquosos foram aplicados diretamente das soluções preparadas no item 4.2.

Após a secagem do solvente das amostras, as placas foram colocadas de forma vertical na cuba cromatográfica contendo fase móvel. A corrida cromatográfica foi desenvolvida até que a fase móvel atingisse aproximadamente 6 cm de altura. A placa foi então retirada da cuba e disposta em circulação de ar para evaporação dos solventes. As cromatoplasas foram então avaliadas sob luz visível, luz ultravioleta (UV) ( $\lambda = 254$  nm) e através de diferentes reveladores indicativos para diferentes grupos de moléculas (Tabela 5).

Devido à grande diferença de polaridade entre os solventes, foram utilizadas diferentes fases móveis de acordo com o solvente de extração dos extratos. Após

alguns testes, as fases móveis escolhidas foram acetona:etanol (1:1), para extratos etanólico e aquosos; Acetato de etila:acetona (1:1), para extratos acetônicos; Hexano:acetato de etila (9:1), para extratos em acetato de etila e hexano:acetato de etila (1:1), para os extratos hexânico.

Tabela 5 – Reveladores utilizados na cromatografia por camada delgada

Grupo de moléculas	Revelador	Resultado
Compostos orgânicos insaturados	Vapores de iodo	Manchas marrons
Esteroides/ Terpenos	Anisaldeído sulfúrico	Manchas rosas ou violáceas após aquecimento a 105 °C por 5 min
Alcaloides	Dragendorff	Manchas alaranjado forte
Antraquinonas	Hidróxido de potássio 5% (m/v) em etanol	Manchas vermelhas
Cumarinas	Cloreto férrico 2% (m/v)	Manchas azuis ou verdes quando expostas a luz UV
Taninos	Hidróxido de potássio 1% (m/v) em etanol	Manchas verdes indicam taninos condensados; Manchas azuis indicam taninos hidrolisáveis; Manchas marrons indicam compostos fenólicos.

FONTE: Adaptada de SWIECH (2018).

#### 4.5 TESTES ANTIMICROBIANOS

O teste de inibição de crescimento microbiano foi realizado pelas metodologias: difusão em ágar por poços e bioautografia direta adaptadas de Valgas et al. (2007). Os microrganismos testados foram *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Candida albicans* (ATCC 10231).

As culturas puras de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *C. albicans* foram inoculadas em caldo BHI (*Brain Heart Infusion*) e mantidas a  $37 \pm 1$  °C por 24 horas. Após o crescimento, as suspensões dos microrganismos foram usadas para inocular

placas com meio de cultivo ágar Müller-Hinton (MH) que foram incubadas por 24 horas a  $37 \pm 1$  °C. O inóculo foi preparado através do método de suspensão direta de colônias em solução salina estéril (0,9% m/v) na concentração de  $10^8$  UFC/mL (turbidez medida por comparação ao tubo 0,5 da escala McFarland).

#### 4.5.1 Difusão em poços

Para o ensaio de difusão em poços, foi utilizado o meio de cultivo ágar MH, preparado conforme orientações do fabricante. O inóculo foi espalhado sobre toda a superfície da placa com auxílio de swab de algodão estéril formando uma camada homogênea e então, em cada placa foram perfurados 5 poços com 10 mm de diâmetro e aproximadamente 20 mm entre eles, com auxílio de cortador estéril.

Para os extratos aquosos, cada extrato foi aplicado sem diluição e em duas diluições seriadas na proporção de 1:1. Para cada extrato orgânico, foi preparada uma solução 20 mg/mL. O extrato foi dissolvido em 200 µL de DMSO e o volume completado com água destilada para 1 mL. A partir dessa solução, também foram preparadas duas diluições seriadas (1:1), obtendo-se as concentrações de 10 mg/mL e 5 mg/mL.

Em cada placa foi aplicado um extrato, com suas diluições, além de controles negativo e positivo. Como controle negativo, foi utilizado o diluente dos extratos (água destilada para extratos aquosos e DMSO:água destilada (1:4) para os extratos orgânicos). E como controle positivo, foi utilizado o antibiótico comercial gentamicina na concentração 0,1 mg/mL. Nas placas do teste com *C. albicans*, o controle positivo usado foi nistatina na concentração 10.000 UI/mL. O volume aplicado nos poços foi de 40 µL e as placas foram incubadas a  $37 \pm 1$  °C. Após 24 horas, os halos de inibição foram observados e o diâmetro foi medido em mm a partir do ponto onde o crescimento do microrganismo diminuía abruptamente. O teste foi realizado em duplicata.

#### 4.5.2 Bioautografia direta

O teste de bioautografia direta foi realizado com placas de CCD onde os extratos foram aplicados e foi desenvolvida cromatografia em camada delgada conforme descrito no item 4.4.4. Em paralelo foram preparadas cromatoplasmas onde

os extratos foram apenas aplicados, mas a cromatografia não foi realizada. Esse procedimento foi realizado para que pudesse ser feita uma análise da atividade do extrato como um todo, sem qualquer separação prévia e também das substâncias após a separação das manchas pela fase móvel.

Para realização do teste, foram preparadas suspensões das culturas puras em caldo BHI e incubadas a  $37 \pm 1$  °C por 24 horas. Após esse período, as suspensões foram despejadas em uma placa de Petri esteril, onde as cromatoplasas foram submersas por exatamente 8 segundos e transferidas para placas de Petri esterilizadas contendo algodão umedecido com água destilada esteril. Elas foram então incubadas em estufa a  $37 \pm 1$  °C por 18 a 24 horas. Para a visualização das áreas com atividade antibacteriana, foi utilizada uma solução de cloreto de azul de nitrotetrazólio 2,5 mg/mL diluído em etanol absoluto (ROSENBERGER, 2018). A solução foi aspergida nas cromatoplasas, que foram então, novamente incubadas a  $37 \pm 1$  °C por 3 a 4 horas e a presença ou ausência de atividade antimicrobiana foi observada.

Nas placas sem desenvolvimento da cromatografia, quando houve a formação de halo de inibição, este foi considerado como a média de cinco medições em diferentes ângulos, partindo-se da borda do *spot* de aplicação do extrato, até o ponto onde havia a mudança de coloração produzida pela presença do revelador.

#### 4.6 TESTE ALELOPÁTICO

Também foi realizada a avaliação do potencial de inibição de crescimento e germinação da planta daninha *Ipomoea nil* (L.) Roth (corriola ou corda-de-viola) pelos extratos. Os extratos aquosos foram utilizados conforme preparo no item 4.2. Para o preparo da solução teste dos extratos orgânicos foram utilizados 2 mL de DMSO para facilitar a dissolução dos extratos e então adicionou-se água destilada qsp 150 mL. As massas utilizadas estão descritas na Tabela 6.

Tabela 6 – Soluções amostra dos extratos orgânicos do cedro para teste de atividade alelopática

Parte da planta	Extrato	Massa (mg)	Concentração (% m/v)
Folhas	Hexano	752,8	0,5
	Acetato de etila	752,1	0,5
	Acetona	753,5	0,5
	Etanol	751,5	0,5
Pecíolos	Hexano	749,4	0,5
	Acetato de etila	*	-
	Acetona	*	-
	Etanol	752,2	0,5
Casca	Hexano	750,9	0,5
	Acetato de etila	750,7	0,5
	Acetona	751,0	0,5
	Etanol	755,3	0,5
Raízes	Hexano	750,0	0,5
	Acetato de etila	*	-
	Acetona	754,3	0,5
	Etanol	753,8	0,5

FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: \* Os extratos não dispunham de massa suficiente para realização do ensaio.

O teste foi realizado em estufa de crescimento vegetal (BOD) com fotoperíodo de 12 horas à temperatura constante de 30 °C. As sementes de *I. nil* passaram por procedimento para quebra de dormência por escarificação química com ácido sulfúrico por 45 minutos (BRASIL, 1992). Após esse tempo, foram lavadas em água corrente e enxaguadas com água destilada. Um total de 50 sementes foram depositadas em cada caixa Gerbox contendo duas folhas de papel de germinação (gramatura 65 g/m<sup>2</sup>) umedecido com 7,5 mL de extrato (volume de solvente correspondente a 2,5 vezes a massa do papel). Um teste branco com água destilada foi preparado em paralelo para avaliar a porcentagem de germinação das sementes sem nenhuma influência, além de um controle de solvente para os extratos orgânicos preparado com 2 mL de DMSO e água destilada qsp 150 mL. Todos os testes foram realizados em quintuplicata. Para manter a umidade adequada para a germinação das sementes, o papel foi umedecido com água destilada quando necessário. As caixas foram dispostas de forma aleatória na BOD, configurando um delineamento inteiramente ao acaso.

As sementes germinadas foram contadas diariamente por 15 dias. Foram consideradas germinadas as sementes com protrusão de radícula de 2 mm ou mais. As sementes germinadas foram mantidas na caixa até o 7º dia após a sua germinação, quando estas foram retiradas para avaliação do seu crescimento através dos parâmetros: comprimento de hipocótilo, comprimento de radícula e



massa fresca da plântula. Foram avaliadas até 20 plântulas por caixa, dependendo do número de sementes germinadas em cada caixa.

Após as avaliações, as plântulas foram congeladas para posterior análise de massa seca. Na análise da massa seca, as amostras foram dessecadas em estufa com circulação de ar a 60 °C por 24 horas. Após resfriadas a temperatura ambiente em dessecador, foram pesadas em balança analítica.

A germinação foi avaliada por meio da porcentagem de germinação, calculada de acordo com as Regras de Análise de Sementes (RAS) (BRASIL, 1992), através da razão entre o número de sementes germinadas e o total de sementes em cada caixa, e pelo IVG (Índice de velocidade de germinação) (MAGUIRE, 1962), conforme a equação:

$$IVG = \frac{G_1}{N_1} + \frac{G_2}{N_2} + \dots + \frac{G_n}{N_n}$$

onde:

IGV = Índice de velocidade de germinação;

$G_1, G_2, \dots, G_n$  = número de sementes germinadas a cada dia;

$N_1, N_2, \dots, N_n$  = número de dias desde o início do teste.

Os dados de IVG, porcentagem de germinação, comprimento de radícula, comprimento de parte aérea, massa fresca e massa seca por plântula foram submetidos análise de variância (ANOVA) e teste de agrupamento de médias Scott-Knott (SCOTT; KNOTT, 1974) a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ), através do software Sisvar (FERREIRA, 2014).

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 EXTRAÇÕES

Para obter compostos bioativos de interesse a partir de um material vegetal, é necessário realizar a extração desses compostos. Mesmo antes da extração, as etapas de coleta, secagem e trituração do material exigem atenção. É importante secar o material para evitar infestação por microrganismos e reduzir a atividade enzimática, o que poderia levar a alterações indesejadas nas características. Inclusive, o material deve ser triturado e homogeneizado antes de ser extraído, para aumentar a superfície de contato, facilitando a extração. Além dos cuidados com as etapas anteriores à extração, diversos fatores podem interferir na eficiência da extração como: o método de extração e o solvente de extração escolhidos, as classes de compostos presentes no material e sua afinidade com o solvente, além de tempo e temperatura da extração (STALIKAS, 2007).

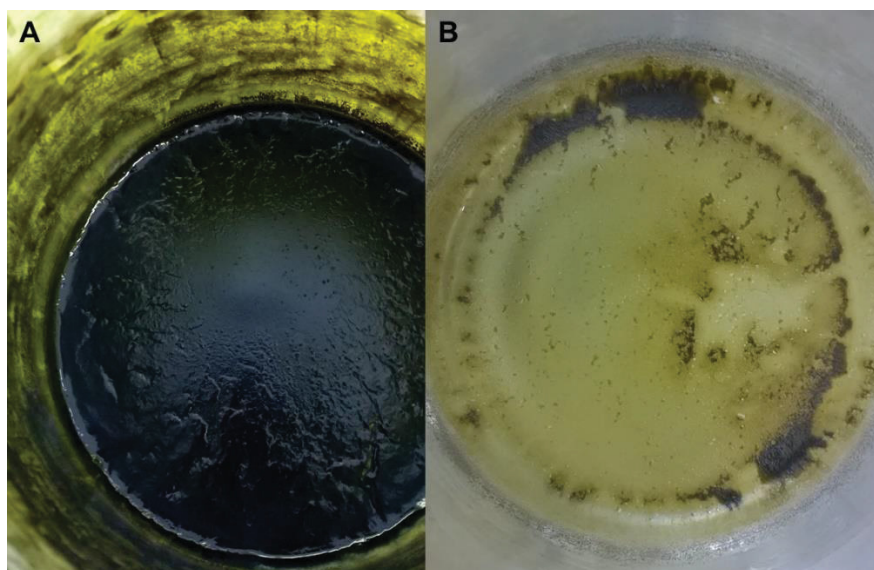
Nesse trabalho, as amostras de cada uma das partes do *C. fissilis* (folhas, pecíolos, cascas e raízes) passaram por extrações em aparato de Soxhlet. Neste método de extração a quente, o solvente de extração e a amostra ficam em compartimentos diferentes, de forma que, a cada novo ciclo, a amostra é extraída por solvente renovado, aumentando a eficiência da extração com uma pequena quantidade de solvente (REGINATTO, 2017). É uma técnica convencional, bastante utilizada para extração de compostos bioativos de produtos naturais (AZMIR et al., 2013).

Os solventes orgânicos utilizados na extração foram escolhidos de forma que tivessem um aumento gradativo de polaridade, aumentando o poder de arraste das substâncias polares presentes na amostra. Dessa forma, optou-se por um solvente apolar, hexano, por dois solventes de polaridade mediana, acetato de etila e acetona e, por último, um solvente com maior polaridade, o etanol. Além disso, a extração por Soxhlet foi realizada sequencialmente como uma forma de reduzir a complexidade de cada extrato bruto, promovendo uma separação prévia dos componentes.

As extrações em Soxhlet resultaram em 16 extratos, quatro extratos para cada parte da planta. Os extratos das folhas apresentaram coloração verde muito intensa, devido à alta concentração de clorofila, além de textura viscosa semissólida

(Figura 18A). A amostra dos pecíolos extraída com hexano e com acetato de etila resultou em dois extratos com coloração verde intensa, o extrato acetônico teve coloração amarela esverdeada (Figura 18B) e o etanólico se tornou marrom amarelado. Todos os extratos dos pecíolos apresentaram textura de uma pasta sólida.

Figura 18 – Aspecto dos extratos secos das folhas de cedro em acetato de etila (A) e dos pecíolos em acetona (B) obtidos por Soxhlet

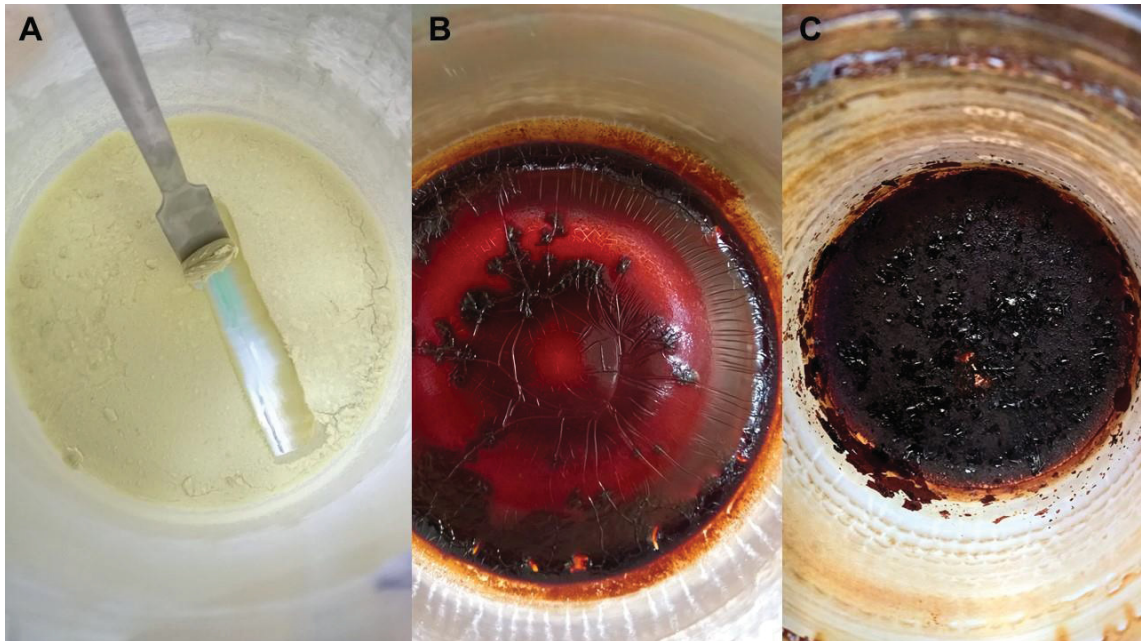


FONTE: A autora (2019).

Quanto aos extratos das cascas, o mais apolar se mostrou como um sólido de cor amarela esbranquiçada, provavelmente devido à presença majoritária de lipídeos (Figura 19A), a extração com o solvente acetato de etila resultou em uma pasta sólida amarela, o extrato em acetona se apresentou com um sólido quebradiço de aspecto vítreo e vermelho vivo (Figura 19B) e o extrato em etanol formou uma pasta sólida de coloração bordô bem intensa (Figura 19C).

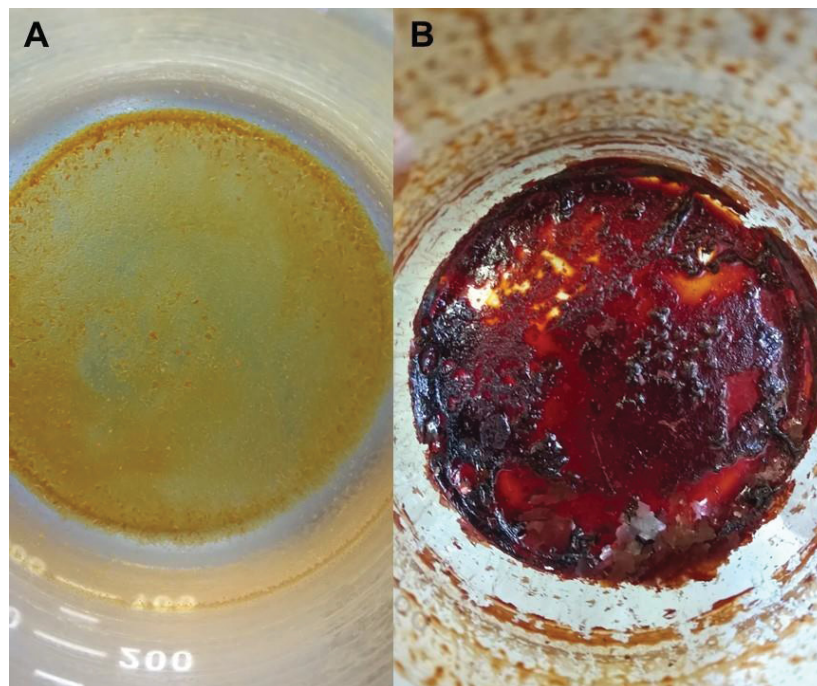
A mistura dos compostos extraídos pelo hexano a partir das raízes consistiu em um extrato viscoso alaranjado de aspecto gorduroso; já os compostos extraídos pelo acetato de etila formaram uma pasta sólida amarela (Figura 20A) e os outros dois extratos têm aspecto semelhante entre si, ambos são sólidos de cor bordô (Figura 20B). O rendimento das extrações orgânicas encontra-se na Tabela 7, calculado em função da massa de amostra utilizada para a extração de cada uma das partes da planta.

Figura 19 – Aspecto dos extratos secos das cascas de cedro em hexano (A), acetona (B) e etanol (C) obtidos por Soxhlet



FONTE: A autora (2019).

Figura 20 – Extratos secos das raízes do cedro em acetato de etila (A) e acetona (B) obtidos por Soxhlet



FONTE: A autora (2019).

Tabela 7 – Rendimento das extrações orgânicas do cedro (% m/m)

Solvente	Parte do cedro			
	Folhas	Pecíolos	Cascas	Raízes
Hexano	3,66	0,97	2,10	3,83
Ac. Etila	1,91	0,42	1,32	0,73
Acetona	1,07	0,36	2,01	3,12
Etanol	2,63	5,83	3,33	4,45
Total	9,27	7,57	8,76	12,12

FONTE: A autora (2019).

Exceto nas folhas, o solvente com maior poder de extrair os componentes do material foi o etanol. Nas folhas, o responsável pelo maior rendimento de extração foi o hexano, solvente capaz de extrair óleos, ceras, esteróis, pigmentos e outras substâncias apolares (ZUANAZZI; MONTANHA; ZUCOLOTTI, 2017). O maior rendimento da extração etanólica foi observado nos pecíolos, isso pode significar que este material possui maior teor de compostos polares em relação às outras partes.

Quanto ao rendimento total das extrações orgânicas, o maior valor foi obtido com as raízes do cedro, seguida das folhas, cascas e, por fim, pecíolos (Gráfico 1A). O mesmo se repetiu nos extratos aquosos, as extrações das raízes demonstraram os maiores rendimentos (Gráfico 1B). Outros autores, trabalhando simultaneamente com extratos vegetais de diferentes partes de uma mesma planta obtiveram maiores rendimentos com o material das raízes (MACKEEN et al., 2000), como neste trabalho, mas o oposto também foi observado (SULTANA; ANWAR; ASHRAF, 2009), tendo em vista que o rendimento depende da espécie de planta testada e é uma função direta do perfil químico da amostra.

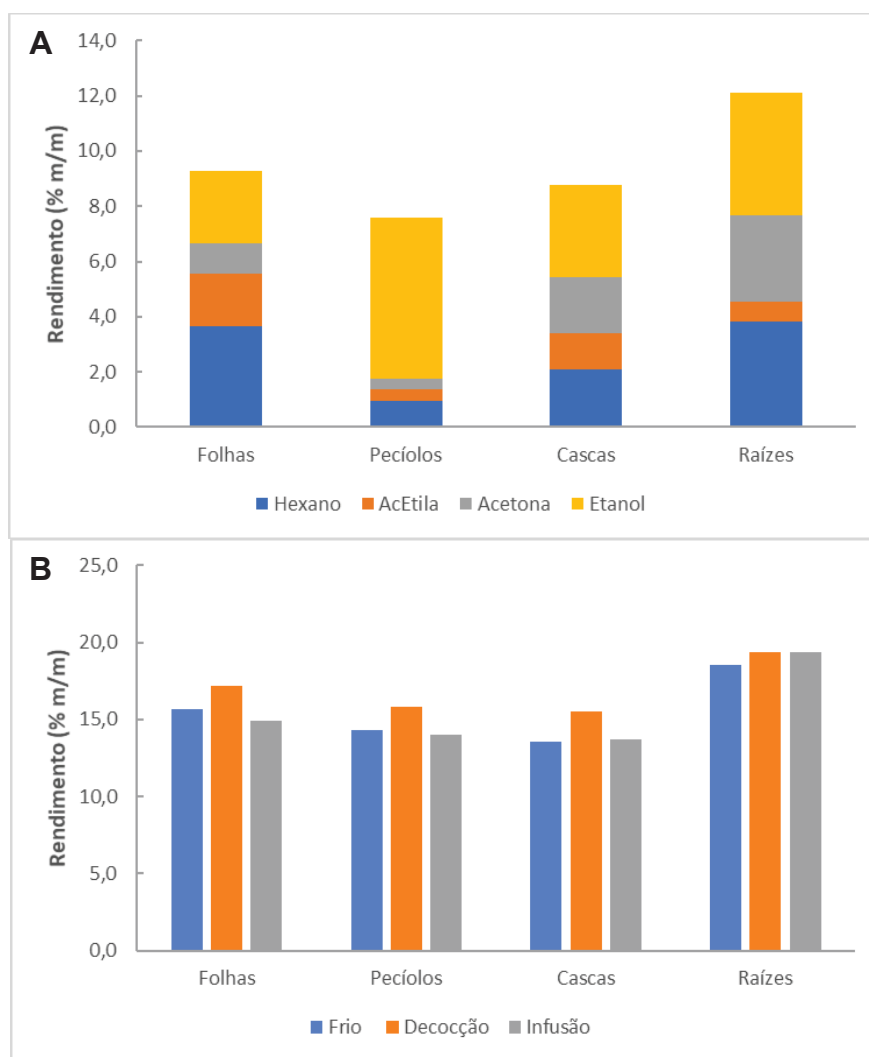
Na Tabela 8 são comparados os rendimentos das extrações aquosas entre os três métodos utilizados, sendo que os rendimentos variaram de 13,53% a 19,39%. É possível observar que para todos os órgãos vegetais, a decocção foi o método mais efetivo na extração. Nesta extração aquosa, a água e a amostra vegetal são mantidas em ebulição durante todo o tempo de extração, o que aumenta o poder de dissolução do solvente, resultando em maior rendimento (REGINATTO, 2017).

Além disso, folhas e pecíolos mostraram o mesmo perfil entre as extrações: decocção teve o maior rendimento, seguida da extração a frio e por fim, a infusão. As cascas e raízes apresentaram uma inversão entre os rendimentos da extração a



frio e da infusão, sendo a primeira responsável pela menor massa de compostos extraídos.

Gráfico 1 – Rendimento das extrações orgânicas por Soxhlet (A) e aquosas (B) das diferentes partes do cedro



FONTE: A autora (2019).

Tabela 8 – Rendimento das extrações aquosas do cedro (% m/m)

Método de extração	Parte do cedro			
	Folhas	Pecíolos	Cascas	Raízes
Frio	15,64	14,34	13,53	18,54
Decocção	17,15	15,79	15,52	19,39
Infusão	14,88	14,03	13,73	19,36

FONTE: A autora (2019).

As três formas de extração aquosas utilizadas são métodos onde o solvente de extração não é renovado, o que faz com que o solvente não tenha a capacidade de exaurir a amostra, mas são preparações semelhantes às preparações caseiras de ervas medicinais. Na infusão, a amostra é colocada em contato com água fervente em um recipiente coberto, o que é mais indicado para as partes moles da planta, como folhas. Já na decocção, a água, em contato com o material vegetal, é mantida em ebulição durante todo o processo, o que é mais indicado para as partes duras da planta, mais difíceis de serem extraídas, como cascas e raízes (REGINATTO, 2017). Ambas têm a desvantagem de que substâncias sensíveis ao calor podem ser perdidas durante o processo, o que também se aplica à metodologia de Soxhlet.

## 5.2 CARACTERIZAÇÃO

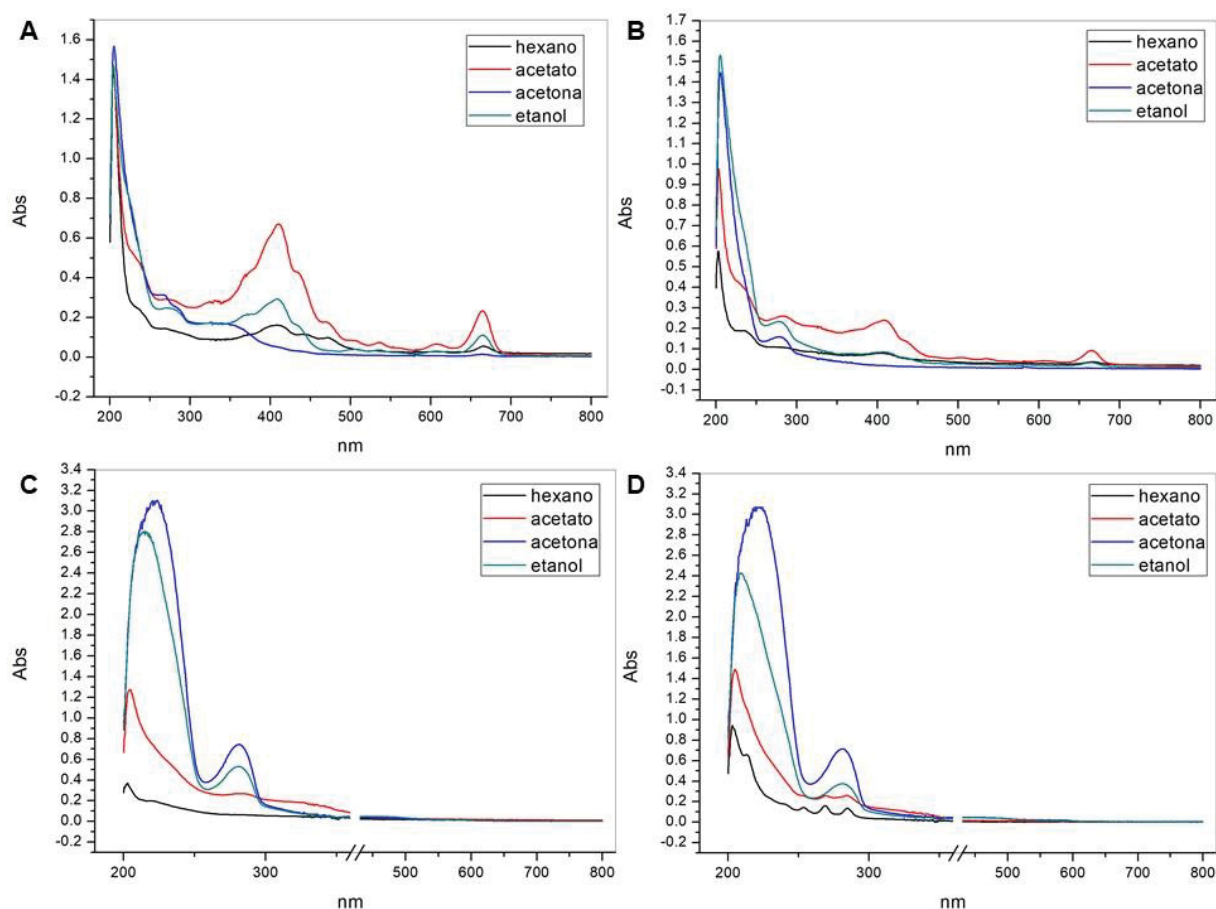
### 5.2.1 Espectros de varredura

Os extratos passaram por uma análise de varredura em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda de 200 a 800 nm, para avaliar o perfil de absorção dos extratos. Para isso, os extratos orgânicos foram diluídos em metanol em concentrações de aproximadamente 50 ppm, os espectros obtidos encontram-se na Figura 21.

Nos espectros das folhas, podem ser observados três picos de absorção, o primeiro entre 200 e 250 nm, o segundo entre 350 e 450 nm e o último entre 650 e 700 nm, é possível que as duas últimas bandas sejam ocasionadas pelos pigmentos presentes nas folhas. A clorofila possui duas bandas de absorção, uma no espectro do azul (em torno de 450 nm) e outra no espectro do vermelho (em torno de 650 nm). Além disso, outros carotenoides presentes nas folhas de plantas superiores apresentam máximos de absorção variando entre 400 e 500 nm (HARBORNE, 1984; LICHTENTHALER; BUSCHMANN, 2001). Os espectros dos pecíolos também apresentaram estas bandas de absorção, mas em menor intensidade.



Figura 21 – Varredura dos extratos orgânicos do cedro



FONTE: A autora (2019).

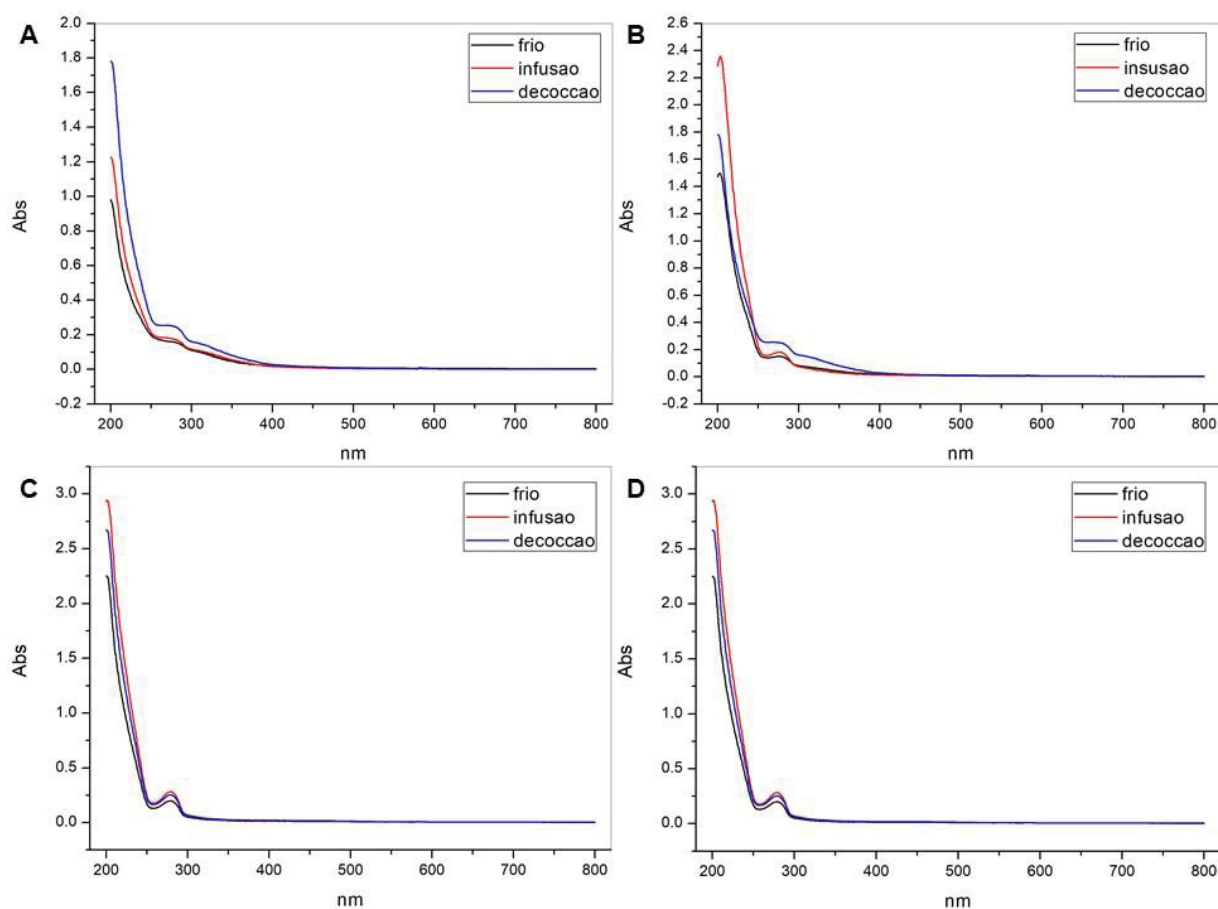
LEGENDA: A: Extratos das folhas; B: Extratos dos pecíolos; C: Extratos das cascas; D: Extratos das raízes.

Em todos os extratos é possível observar algumas bandas de absorção em torno de 200 a 300 nm. As absorções mais próximas ao comprimento de onda de 200 nm, podem ser causadas por vários cromóforos como ligações carbono-carbono, carbonilas ou anéis benzênicos, presentes nas estruturas dos compostos orgânicos (CEREMPEI et al., 2016). Além disso, diversos tipos de compostos fenólicos possuem absorções entre 200 e 300 nm, entre eles, compostos com atividade biológicas como cumarinas e flavonoides (HARBORNE, 1984; ROBARDS; ANTOLOVICH, 1997). Nos extratos mais apolares das cascas e raízes, há uma banda de absorção entre 250 e 300 nm. Esta banda pode indicar a presença de antocianinas (HARBORNE, 1984), uma vez que estes extratos apresentam coloração vermelha ou bordô. Além disso, estas bandas podem indicar presença de terpenoides (ZAVOI et al., 2011), compostos que já foram identificados em extratos

de *C. fissilis* (MAIA et al., 2000; LAGO et al., 2004; LEITE et al., 2005; AMBROZIN et al., 2006; LEITE et al., 2008).

Os extratos aquosos também passaram pela varredura nos mesmos comprimentos de onda, mas estes se encontravam diluídos em água destilada na proporção de 1:200 (Figura 22). Estes extratos apresentaram absorções apenas no espectro ultravioleta, devido aos grupos cromóforos dos compostos orgânicos presentes, incluindo a presença de compostos fenólicos.

Figura 22 – Varredura dos extratos orgânicos do cedro



FONTE: A autora (2019).

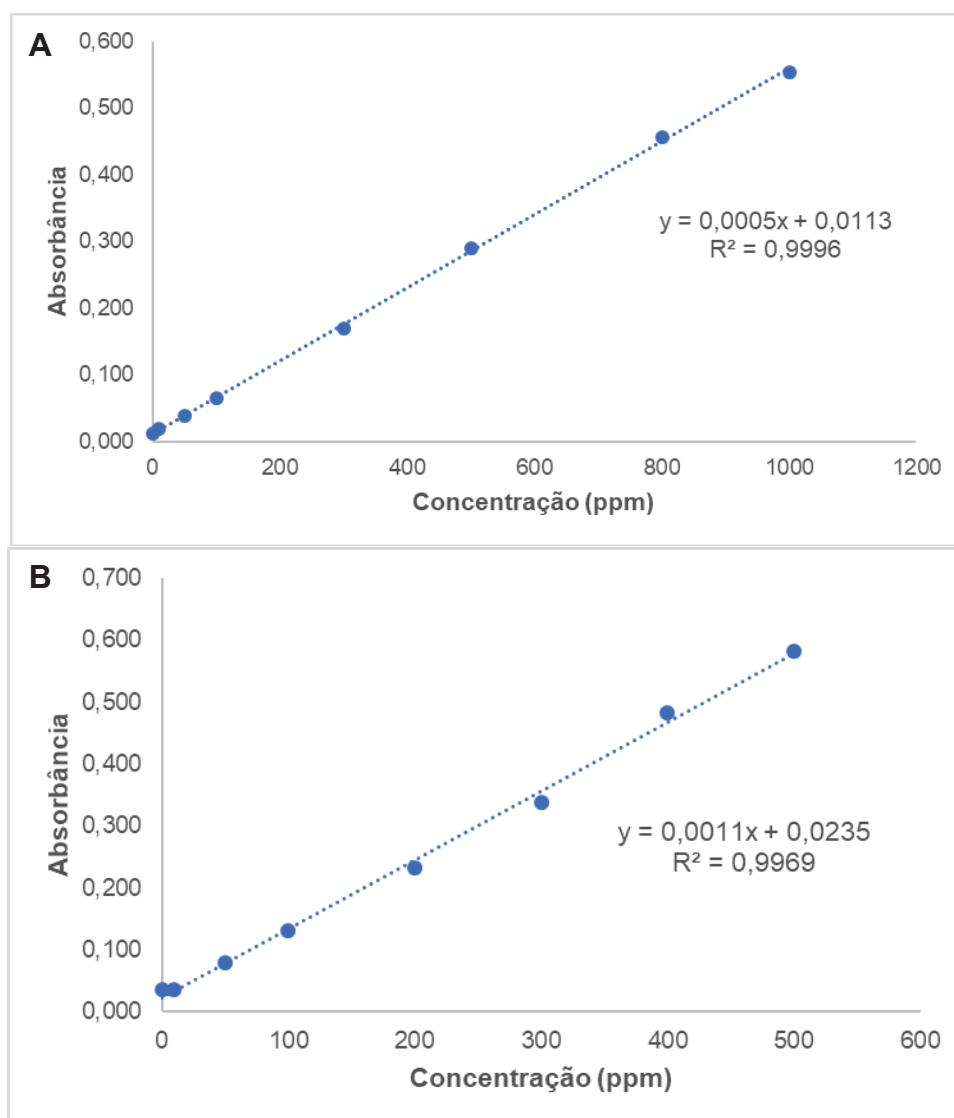
LEGENDA: A: Extratos das folhas; B: Extratos dos pecíolos; C: Extratos das cascas; D: Extratos das raízes.

### 5.2.2 Conteúdo de compostos fenólicos

Os compostos fenólicos ou fenóis são amplamente distribuídos dentro do reino vegetal. Sua quantificação pode ser feita com auxílio do reagente Folin-Ciocalteu, já que os constituintes fosfomolibdato e fosfotungstato presentes são

capazes de reagir com as hidroxilas fenólicas livres destes compostos (de MELLO; SANTOS, 2017). Em um meio alcalino, os fenóis presentes na amostra são oxidados, formando um radical livre que, por sua vez, interage com o reagente Folin-Ciocalteu, formando um complexo azul facilmente quantificado (SAJEESH; ARUNACHALAM; PARIMELAZHAGAN, 2011). Esta quantificação é feita através da comparação das absorbâncias das amostras com uma curva analítica, onde a absorbância de um composto padrão é quantificada em concentrações conhecidas. As curvas analíticas preparadas a partir do padrão de ácido gálico podem ser observadas na Gráfico 2.

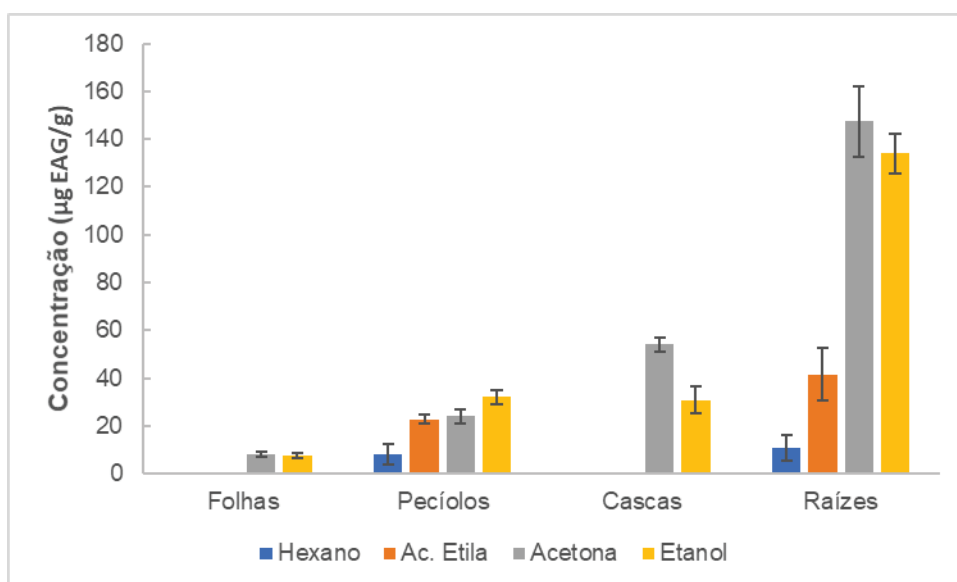
Gráfico 2 – Curva analítica para determinação de compostos fenólicos nos extratos orgânicos (A) e aquosos (B)



FONTE: A autora (2019).

As concentrações dos compostos fenólicos dos extratos orgânicos, descritas em termos de  $\mu\text{g}$  de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato seco, encontram-se na Gráfico 3. Não foram detectados fenóis nos extratos em hexano e acetato de etila das folhas e cascas. E, mesmo nos pecíolos e raízes, onde houve detecção, a concentração é menor em relação aos extratos mais polares das mesmas partes, isso demonstra uma maior afinidade dessa classe de moléculas por solventes com polaridades crescentes. Como observado por Tzima, Brunton e Rai (2018), em geral solventes mais polares, como etanol, metanol ou misturas hidroalcoólicas, são os mais utilizados para extração de polifenóis.

Gráfico 3 – Concentração de compostos fenólicos nos extratos orgânicos do cedro



FONTE: A autora (2019).

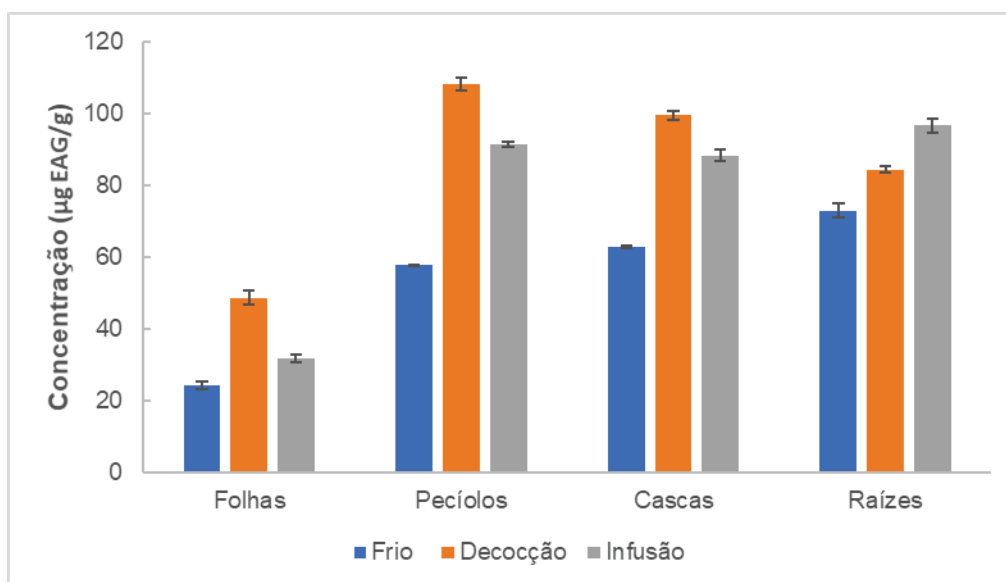
LEGENDA: Valores expressos em  $\mu\text{g}$  de equivalentes de ácido gálico por g de extrato. As barras representam a média de três repetições  $\pm$  desvio padrão.

Os extratos com maiores teores de fenóis foram os extratos acetônico e etanólico das raízes ( $147,40 \mu\text{g EAG/g}$  e  $134,07 \mu\text{g EAG/g}$ , respectivamente). Os compostos fenólicos podem ser produzidos pelas plantas para atuar na defesa contra patógenos e por sua importância em interações com microrganismos simbióticos (TAIZ; ZEIGER, 2009). As raízes do cedro podem estar produzindo uma quantidade maior destes compostos graças a maior interação com os organismos do solo, sejam interações benéficas ou patogênicas.

Os extratos metanólicos das folhas e cascas de *Cedrela serrata* demonstraram conteúdo de compostos fenólicos de  $120 \mu\text{g EAG/g}$  e  $350 \mu\text{g EAG/g}$

(AHMAD et al., 2013), valores maiores que os observados neste trabalho, provavelmente devido a diferenças no método de extração escolhido e às características metabólicas intrínsecas de cada espécie. Mas é interessante observar que o perfil se manteve o mesmo, as cascas também acumularam uma quantidade maior de fenóis que as folhas. Nos extratos aquosos do cedro, os teores de fenóis variaram desde 24,46  $\mu\text{g}$  EAG/g de extrato seco, na extração das folhas por maceração, até 108,34  $\mu\text{g}$  EAG/g, na decocção dos pecíolos, como pode ser observado na Gráfico 4.

Gráfico 4 – Concentração de compostos fenólicos nos extratos aquosos do cedro



FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: Valores expressos em  $\mu\text{g}$  de equivalentes de ácido gálico por g de extrato. As barras representam a média de três repetições  $\pm$  desvio padrão.

As diferentes extrações aquosas evidenciaram um perfil comum entre folhas, pecíolos e cascas, onde a maior eficiência na extração de fenóis ocorreu na decocção, seguida da infusão e da extração a frio. Isso não se reproduziu para as raízes, que apresentaram mais compostos fenólicos na extração por infusão. Na decocção das raízes, pode ter havido degradação de alguns dos compostos em função do maior tempo sob temperatura elevada. Apesar disso, todas as extrações aquosas a quente, apresentaram resultados maiores que as extrações a frio. Dutra; Leite e Barbosa (2008) concluíram que o calor aumenta a eficiência da extração dos compostos fenólicos, pois aumenta a liberação dos fenóis ligados a biomoléculas.

Nos extratos produzidos através do Soxhlet, é provável que compostos fenólicos possam ter sofrido degradação térmica em função do tempo prolongado em que o extrato ficou submetido ao aquecimento (DUTRA.; LEITE; BARBOSA, 2008).

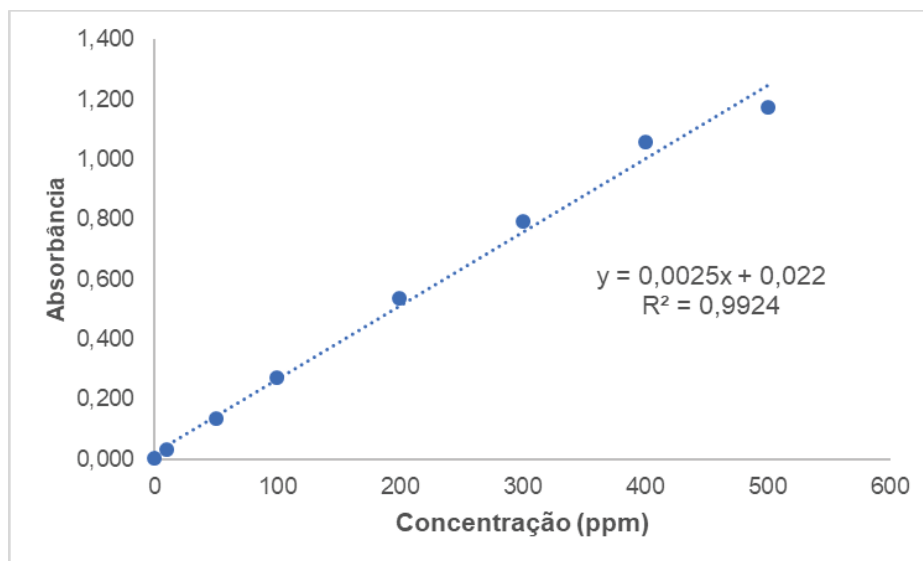
### 5.2.3 Conteúdo total de flavonoides

A quantificação de flavonoides dos extratos foi executada através da metodologia colorimétrica do cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ). Estes compostos podem ser quantificados através de espectrofotômetro graças ao complexo de coloração amarela formado pelo  $\text{AlCl}_3$  com as hidroxilas dos anéis aromáticos presentes nos flavonoides (CHANG et al., 2002; DUTRA; LEITE; BARBOSA, 2008). Métodos espectrofotométricos de quantificação de flavonoides são muito usados em análises fitoquímicas, pois não necessitam de equipamentos sofisticados, grandes quantidades de reagentes e são procedimentos rápidos em relação aos métodos cromatográficos de quantificação.

Para que os flavonoides sejam adequadamente quantificados, é necessário comparar as absorbâncias das amostras com uma curva analítica preparada com várias concentrações de um flavonoide de referência, nesse caso quercetina. A curva analítica preparada para os extratos orgânicos encontra-se no Gráfico 5. Não foram detectados flavonoides nos extratos orgânicos através da metodologia utilizada.

O cloreto de alumínio forma complexos com uma gama de flavonoides, sendo um método capaz de quantificar esses compostos de forma geral. Mas os complexos formados entre o  $\text{AlCl}_3$  e as diferentes classes de flavonoides nem sempre absorvem as mesmas frequências de radiação. Diferentes números de hidroxilas vizinhas, podem resultar em pequenas variações no comprimento de onda máximo de absorção do complexo formado (WOISKY; SALATINO, 1998). Embora nenhum dos extratos orgânicos tenha demonstrado presença de flavonoides sob o método de complexação com o  $\text{AlCl}_3$ , não é possível afirmar que estas amostras estão completamente isentas da presença destes compostos. Uma possibilidade é que as variações do comprimento de onda de absorção do complexo formado citadas por Woisky e Salatino (1998) possam ter contribuído para este resultado.

Gráfico 5 – Curva analítica para determinação de flavonoides nos extratos orgânicos do cedro

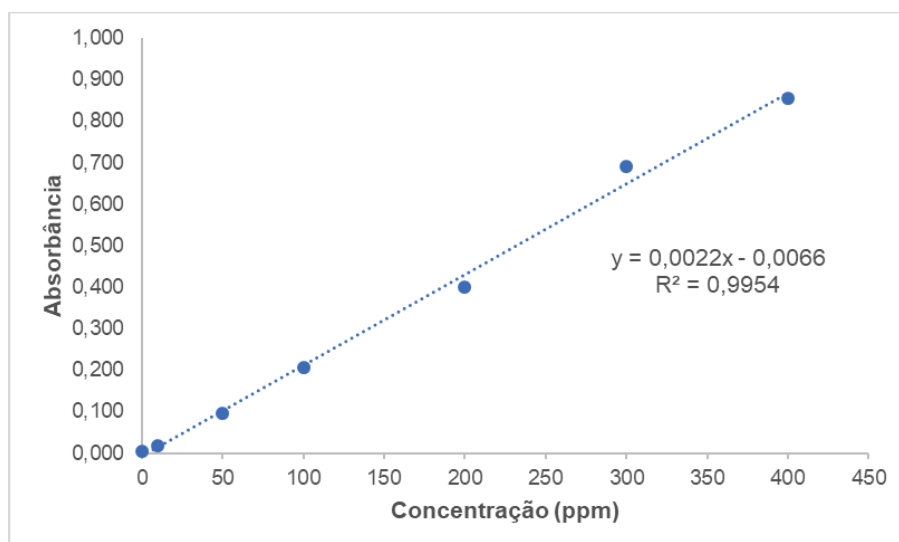


FONTE: A autora (2019).

Também é importante ressaltar, embora os extratos apresentassem polaridades divergentes entre si, todos os extratos foram dissolvidos em metanol, para possibilitar a comparação entre os resultados. Mojzer e outros (2016), destacam que alguns flavonoides, como isoflavonas, flavanonas e flavonois são pouco polares. Caso algum dos extratos do cedro apresente estes tipos de flavonoides, o uso de um diluente polar como o metanol pode ter dificultado a sua solubilização, comprometendo sua quantificação. Além disso, alguns flavonoides podem ter sido degradados devido às temperaturas usadas durante a extração por Soxhlet. O aquecimento da amostra pode levar à perda de flavonoides e de outros compostos fenólicos por decomposição química, enzimática ou térmica, além de perdas por volatilização (DUTRA; LEITE; BARBOSA, 2008).

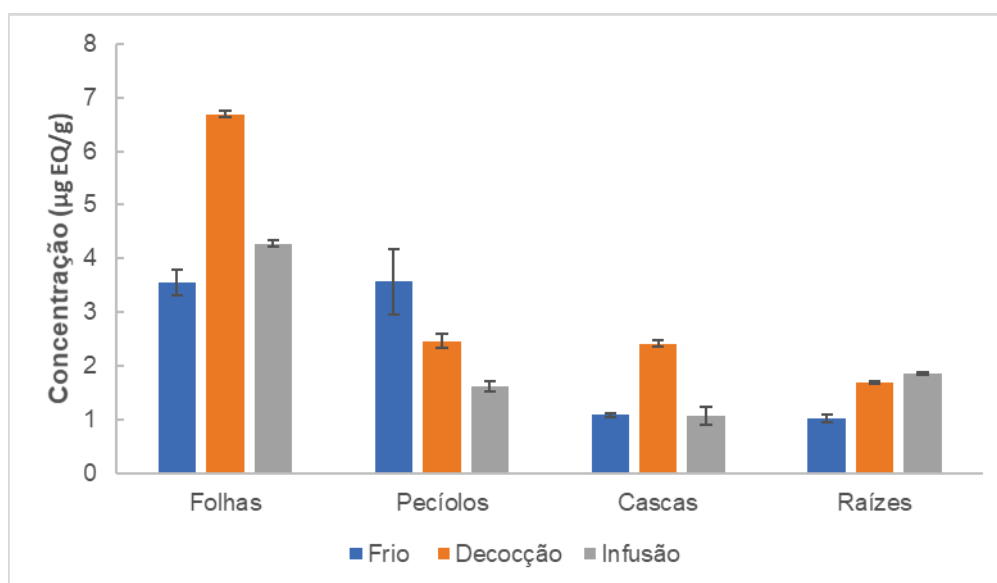
Os extratos aquosos também foram testados para seu conteúdo de flavonoides através da curva analítica que pode ser observada no Gráfico 6. Os resultados observados foram baixos (Gráfico 7), variando de 1,04 a 6,69 µgEQ/g, sendo os maiores valores observados nas folhas. Em plantas de *C. serrata* também observou-se que os extratos das folhas apresentavam maiores concentrações de flavonoides em relação à sua casca, o resultado foi 5,5 vezes maior (AHMAD et al., 2013). Diante dos resultados obtidos, pode-se afirmar que os flavonoides representam a minoria entre os compostos fenólicos presentes nos extratos, tendo em vista que o conteúdo total de fenóis dos extratos variou entre 24,46 µg a 108,34 µg EAG/g.

Gráfico 6 – Curva analítica para determinação de flavonoides nos extratos aquosos



FONTE: A autora (2019).

Gráfico 7 – Concentração de flavonoides nos extratos aquosos do cedro



FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: Valores expressos em µg de equivalentes de quercetina por g de extrato. As barras representam a média de três repetições ± desvio padrão.

O método extrativo que proporcionou a maior extração de flavonoides variou entre as diferentes partes do cedro. A decocção resultou em mais flavonoides nos extratos de folhas e cascas, mas nas raízes a infusão obteve um resultado maior e nos pecíolos, a extração a frio. Embora a extração a frio tenha tido as menores concentrações nas outras partes, nos pecíolos a concentração foi superior aos dois métodos a quente. Podemos concluir que parte dos flavonoides presentes nos pecíolos é termossensível, podendo ter sido degradados pela temperatura.



Cerempei e colaboradores (2016), observaram que o aumento da temperatura aumentou a extração de flavonoides em extratos aquosos de folhas de *Cydonia oblonga* Miller. O mesmo foi observado neste trabalho para as extrações aquosas das folhas do cedro e também para as cascas. É possível que as extrações a quente consigam extrair mais flavonoides e outros compostos fenólicos que estejam ligados à celulose ou outras estruturas da célula. Diferentemente deste trabalho, a presença de flavonoides foi identificada no extrato alcoólico de folhas e cascas de *C. serrata* (AHMAD et al., 2016).

Dentre os flavonoides detectados nos extratos aquosos, é possível que estejam flavonoides glicosilados e agliconas polares, compostos extraídos por sistemas polares (MOJZER et al., 2016). Além disso, de acordo com Zuanazzi, Montanha e Zucolotto (2017), métodos de infusão e decocção promovem a extração de heterosídeos mais polares, como poliglicosídeos, flavanodíolos, catequinas e procianidinas.

#### 5.2.4 Atividade antioxidante

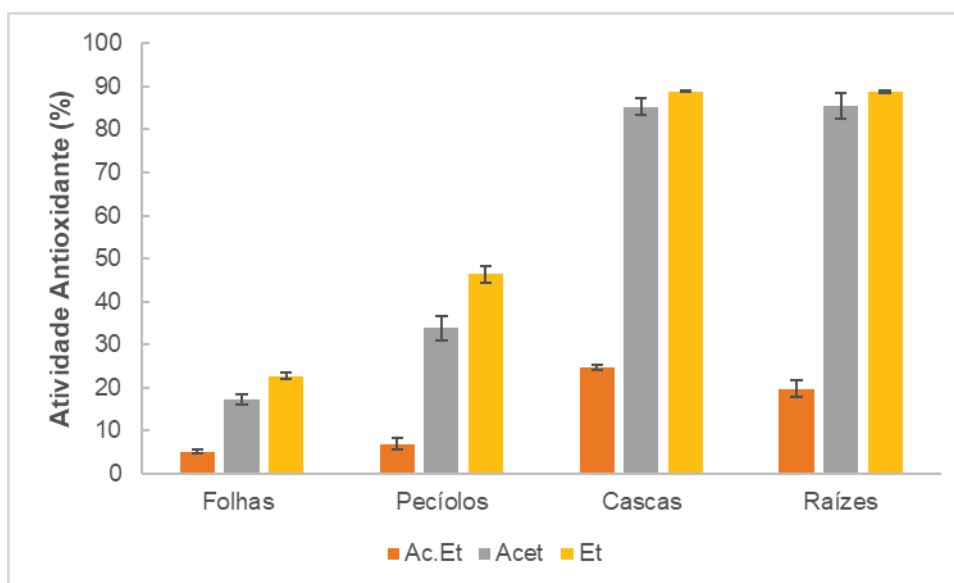
Um antioxidante é uma substância que, mesmo que sua concentração seja muito pequena, é capaz de impedir a oxidação de substratos facilmente oxidados (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997; SAJEESH; ARUNACHALAM; PARIMELAZHAGAN, 2011). A atividade antioxidante de um composto ou de um extrato pode ser medida através de sua habilidade de estabilizar elétrons desemparelhados (PERVEEN et al., 2012). Substâncias com elétrons desemparelhados são chamadas de espécies reativas ou radicais livres, como o DPPH. O DPPH possui um elétron livre que se descola por toda a molécula produzindo uma coloração roxa, que resulta em uma banda de absorção em 517 nm. Em contato com uma substância antioxidante, o DPPH é reduzido, resultando em uma visível descoloração (KOLEVA et al., 2002; DUTRA; LEITE; BARBOSA, 2008; DO et al., 2014).

Durante todo o trabalho com os extratos orgânicos, houveram problemas de solubilidade, devido à grande diferença de polaridade entre os solventes de extração. Em virtude disso, todas as metodologias de caracterização passaram por algumas adaptações entre extratos aquosos e orgânicos para garantir a confiabilidade dos resultados. No teste de atividade antioxidante, optou-se por

dissolver cada um dos solventes em seu próprio solvente de extração e não em um diluente comum a todos os extratos. Em testes fitoquímicos, a atividade antioxidante dos extratos é estreitamente dependente do tipo de solvente de extração utilizado, uma vez que há uma grande variedade de características químicas no material vegetal, compostos antioxidantes presentes no extrato podem não ser solúveis em um determinado solvente (SULTANA; ANWAR; ASHRAF, 2009).

O Gráfico 8 apresenta a atividade antioxidante demonstrada pelos extratos orgânicos. Os extratos hexânicos de todas as partes testadas não manifestaram atividade antioxidante significativa sob a metodologia testada. Os extratos em acetato de etila foram os menos ativos e os etanólicos tiveram as maiores atividades. Estes resultados são bastante semelhantes aos obtidos por Dutra, Leite e Barbosa (2008) em extrações com sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel por metodologia de Soxhlet.

Gráfico 8 – Atividade antioxidante dos extratos orgânicos do cedro



FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: Valores expressos em porcentagem de atividade antioxidante em relação ao branco. As barras representam a média de três repetições  $\pm$  desvio padrão.

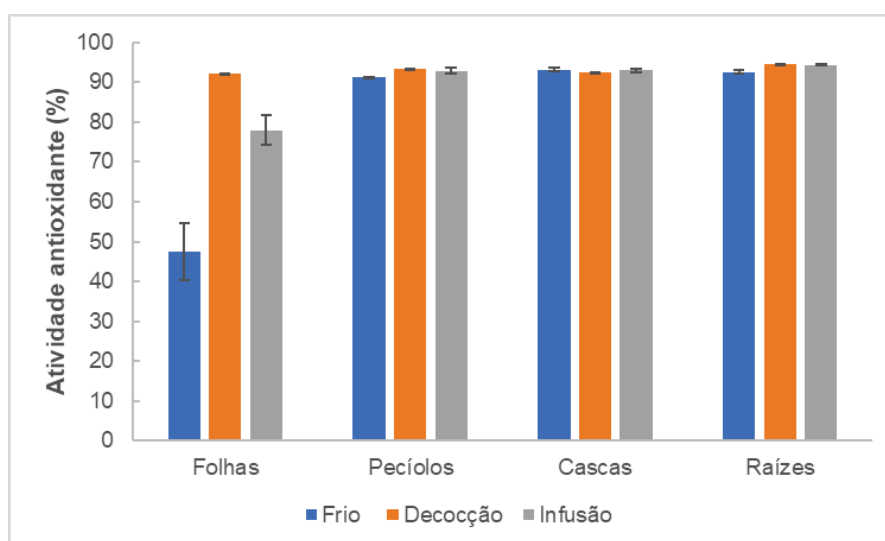
A menor atividade foi apresentada pelo extrato obtido das folhas em acetato de etila, apenas 5,2% de inibição do radical DPPH. Como não foram quantificados compostos fenólicos neste extrato, esta atividade se deve a outra classe de compostos com potencial redutor. As maiores foram as atividades dos extratos acetônico e etanólico das cascas e raízes, com inibições variando entre 85% e 89%.

Os solventes mais usados na literatura para extração de compostos antioxidantes são alcoólicos ou misturas hidroalcoólicas. Diversos trabalhos demonstraram atividade antioxidante de extratos alcoólicos de diferentes plantas (MENSOR et al., 2001; KOLEVA et al., 2002; MILIAUSKAS; VENSKUTONIS; van BEEK, 2004; POURMORAD; HOSSEINIMEHR; SHAHABIMAJD, 2006; NILE; NILE; KEUM, 2017).

O ácido ascórbico é uma molécula com potente capacidade antioxidante. Sua atividade foi testada sob a mesma metodologia e os resultados obtidos apontaram que os extratos orgânicos polares de cascas e raízes possuem atividade comparável a da solução 50 ppm de ácido ascórbico.

Os extratos aquosos também apresentaram atividades antioxidantes interessantes (Gráfico 9). As folhas apresentaram as menores inibições do radical DPPH, seus extratos a frio e por infusão apresentaram, respectivamente, 47,6% e 78,0% de atividade. Todos os outros extratos apresentaram atividades acima de 90%, atividade semelhante a 500 ppm de ácido ascórbico. Nos resultados próximos a 100%, pode-se considerar que o DPPH foi completamente reduzido, já que a descoloração comparada ao solvente puro não pode ser atingida novamente. O término da reação resulta em uma absorbância residual acima de 7% (MILIAUSKAS; VENSKUTONIS; van BEEK, 2004). Esta alta atividade sequestradora de radicais livres demonstrada pelos extratos aquosos do cedro pode ter alguma relação com os usos medicinais citados.

Gráfico 9 – Atividade antioxidante dos extratos aquosos do cedro



FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: Valores expressos em porcentagem de atividade antioxidante em relação ao branco. As barras representam a média de três repetições  $\pm$  desvio padrão.

Sabe-se que compostos fenólicos possuem grande capacidade de sequestrar radicais livres (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1996; CAI et al., 2004). Os flavonoides e demais compostos fenólicos presentes nos extratos aquosos podem ter contribuído para as marcantes atividades antioxidantes observadas, mas é provável que outros compostos antioxidantes estejam presentes. A atividade antioxidante dos flavonoides, além da ação sequestradora de radicais livres, se dá pela regulação de enzimas envolvidas em processos de estresse oxidativo e por complexação dos metais envolvidos na formação dos radicais (MOJZER et al., 2016).

Os diferentes grupos de substâncias têm diferentes níveis de contribuição para a atividade total de cada um dos extratos (XU; CHANG, 2007). É possível notar uma relação entre atividade inibitória do radical DPPH e sistema de solvente utilizado na extração. Em trabalho realizado com diversas plantas medicinais com extratos em acetona, acetato de etila e metanol, Miliauskas, Venskutonis e van Beek (2004), evidenciaram que extratos alcoólicos apresentaram as maiores atividades antioxidantes. Uma das plantas testadas, *Potentilla fruticosa* L., demonstrou perfil semelhante ao obtido neste trabalho com as cascas e raízes, extratos acetônico e alcoólico com inibição do DPPH acima de 90% e extrato em acetato de etila com menor taxa de inibição.

Tanto nos extratos aquosos como nos orgânicos, as folhas apresentaram as menores atividades antioxidantes em relação as outras partes da planta. Ahmad et al. (2013), observaram o mesmo em extratos de *C. serrata*. Os autores obtiveram resultados significativamente maiores nas cascas em relação às folhas. Ahmad e colaboradores (2016), observaram que algumas frações dos extratos de folhas e cascas da mesma espécie tiveram atividade antioxidante comparável ao controle positivo. Outro estudo demonstrou a atividade antioxidante do extrato metanólico das folhas e de suas frações, sendo o extrato bruto o mais eficiente em sequestrar radicais (PERVEEN et al., 2012). Além disso, trabalhos constataram atividade antioxidante de compostos isolados das folhas de *C. sinensis*: quercitrina (BAK et al., 2011),  $\alpha$ -tocopherol, escopoletina, luteína e metil-galato (HWANG et al., 2005).

### 5.2.5 Caracterização por Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

A técnica de CCD é bastante utilizada como *screening* fitoquímico pois é uma análise rápida, versátil e de fácil execução, com preparação de amostras simples, pequeno volume de solventes e reagentes necessários, além de permitir uma fácil comparação entre amostras (LOPES, 2006; VOGEL, 2011). É uma técnica de separação baseada na migração diferencial dos compostos de uma mistura, de acordo com a interação de cada um desses compostos com duas fases imiscíveis, fase móvel e fase estacionária (LOPES, 2006).

É realizada em uma matriz de um material adsorvente, chamada de fase estacionária, de forma que a separação ocorra de forma unidimensional. As amostras são aplicadas na base da placa, que é colocada em uma cuba contendo fase móvel adequada. A fase móvel no fundo da cuba sobe de forma ascendente pela placa graças a capilaridade e vai levando consigo os compostos da amostra. Quando a corrida cromatográfica termina e a placa é retirada da cuba, os compostos da mistura estão dispostos como manchas separadas acima do *spot* de aplicação (LOPES, 2006; SAJEESH; ARUNACHALAM; PARIMELAZHAGAN, 2011; VOGEL, 2011).

A separação das manchas ocorre pela afinidade dos compostos com as duas fases. Os compostos podem ser retidos pela fase estacionária ou se moverem pela cromatoplaça, quando dissolvidos na fase móvel. Esse processo resulta em migrações diferenciais das substâncias, ou seja, os componentes da mistura têm diferentes velocidades ao passarem pela fase estacionária. Estas diferentes velocidades dependem da estrutura molecular do composto e de suas propriedades químicas, principalmente a presença de diferentes grupos funcionais (SAJEESH; ARUNACHALAM; PARIMELAZHAGAN, 2011).

Após a corrida, as cromatoplaças podem ser observadas sob luz visível, luz ultravioleta ou aspergidas com diferentes soluções reveladoras, que buscam tornar visíveis os compostos incolores, além de indicar a presença ou ausência de determinados grupos de compostos. Na Tabela 9 são mostrados os resultados qualitativos obtidos com reveladores para os extratos orgânicos e a Tabela 10 demonstra os resultados dos extratos aquosos.

Tabela 9 – Grupos de compostos presentes nos extratos orgânicos do cedro

Extrato		INS	E/T	ALC	ANT	CUM	FEN	TC	TH
Folhas	Hexano	+	+	-	-	-	+	+	-
	Ac. Etila	+	+	-	-	-	+	+	+
	Acetona	+	+	-	+	-	+	+	+
	Etanol	+	+	-	+	+	+	-	-
Pecíolos	Hexano	+	+	-	-	-	+	-	-
	Ac. Etila	+	+	-	-	+	+	+	+
	Acetona	+	+	-	+	+	+	+	-
	Etanol	+	+	-	+	+	+	+	-
Casca	Hexano	+	+	-	-	+	-	-	-
	Ac. Etila	+	+	-	+	+	+	+	+
	Acetona	+	+	-	+	+	+	-	+
	Etanol	+	+	-	+	+	+	-	+
Raízes	Hexano	+	+	-	-	+	-	-	-
	Ac. Etila	+	+	-	+	+	+	+	+
	Acetona	+	+	-	+	+	+	+	+
	Etanol	+	+	-	+	+	+	-	+

FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: INS: Compostos insaturados; E/T: Esteroides/Terpenos; ALC: Alcaloides; ANT: Antraquinonas; CUM: Cumarinas; FEN: Compostos fenólicos; TC: Taninos condensados; TH: Taninos hidrolisáveis.

Tabela 10 – Grupos de compostos presentes nos extratos aquosos do cedro

Extrato		INS	E/T	ALC	ANT	CUM	FEN	TC	TH
Folhas	Frio	+	+	-	+	-	+	-	-
	Decocção	+	+	-	+	-	+	-	-
	Infusão	+	+	-	+	-	+	-	-
Pecíolos	Frio	+	+	-	+	-	+	-	-
	Decocção	+	+	-	+	-	+	-	-
	Infusão	+	+	-	+	-	+	-	-
Casca	Frio	+	+	-	+	-	+	+	-
	Decocção	+	+	-	+	+	+	-	-
	Infusão	+	+	-	+	+	+	-	-
Raízes	Frio	+	+	-	+	+	+	+	-
	Decocção	+	+	-	+	+	+	+	-
	Infusão	+	+	-	+	+	+	-	-

FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: INS: Compostos insaturados; E/T: Esteroides/Terpenos; ALC: Alcaloides; ANT: Antraquinonas; CUM: Cumarinas; FEN: Compostos fenólicos; TC: Taninos condensados; TH: Taninos hidrolisáveis.

A maioria dos extratos orgânicos apresentou compostos coloridos com diferentes fatores de retenção na CCD. Nas folhas e pecíolos, as manchas coradas eram verdes e amarelas, já nas cascas e raízes, as cores predominantes foram amarelo e vermelho. Através da observação das placas sob radiação UV, foi

possível observar que haviam muito mais compostos do que foi possível observar sob luz visível (APÊNDICE 1). A radiação ultravioleta, é capaz de excitar alguns compostos incolores, fazendo com que se tornem fluorescentes (LOPES, 2006).

Além disso, através dos reveladores foi possível identificar alguns grupos de moléculas que se encontravam nos extratos. No teste de Dragendorff, nenhum extrato foi positivo para alcaloides. Este teste é baseado na cor das manchas após o teste, então a presença de compostos coloridos no extrato pode ter prejudicado a visualização do resultado.

Todos os extratos apresentaram compostos insaturados e terpenos. Os compostos insaturados são revelados através da incubação das placas em câmara saturada com vapores de iodo. O iodo é um revelador geral, forma manchas marrons com todo tipo de compostos insaturados. As manchas são formadas pela adição de uma molécula de iodo à insaturação (LOPES, 2006). Na reação de Liebermann-Burchard, esteroides e terpenos sofrem reações de desidratação e oxidação fazendo com que apresentem coloração vermelha, rosa, púrpura, violeta ou azul-esverdeada (REGINATTO, 2017). A presença de terpenos em todos os extratos, resultado obtido pelo revelador anisaldeído sulfúrico, indica que estes compostos são distribuídos por toda a planta e apresentam diversidade estrutural, já que foram encontrados desde os extratos hexânicos até os aquosos. Há, na literatura consultada, relatos de diferentes terpenos identificados na espécie *C. fissilis* (LEITE et al., 2005; AMBROZIN et al., 2006; LEITE et al., 2008). Os terpenos são muitas vezes produzidos pelas plantas para afastar insetos (TAIZ; ZEIGER, 2009), atividade que já foi verificada no cedro (LEITE et al., 2005; AMBROZIN et al., 2006; MATOS, 2006; MATOS et al., 2010).

Todas as partes da planta demonstraram presença de antraquinonas, mas estas moléculas não foram encontradas nos extratos mais apolares. As antraquinonas são compostos fenólicos e o revelador utilizado baseia-se na reação de Bornträger, onde a alcalinização das antraquinonas, resulta na ionização das hidroxilas fenólicas, tornando-as vermelhas (REGINATTO, 2017). A babosa (*Aloe vera* (L.) Burm. f.), a cáscara-sagrada (*Rhamnus purshiana* DC.) e o sene (*Senna alexandrina* Mill.) são plantas medicinais que contém grande conteúdo de antraquinonas, além disso, o principal uso farmacológico das antraquinonas se deve às suas propriedades laxativas (FALKENBERG, 2017).



As cumarinas foram detectadas sob luz UV após aspersão de solução alcalina. Todas as partes demonstraram a presença de cumarinas em pelo menos um dos extratos, mas esta presença foi mais evidente em cascas e raízes. As cumarinas são compostos fenólicos produzidos pela planta como defesa contra insetos e fungos (TAIZ; ZEIGER, 2009), o que pode explicar a presença mais significativa nestas partes. São conhecidas por suas propriedades antimicrobianas, anticoagulantes, antioxidantes, anti-inflamatórias, neuroprotetivas, de combate ao câncer, entre outras (VENUGOPALA; RASHMI; ODHAV, 2013; CIURA et al., 2017).

Além das cumarinas, os taninos também são uma classe de compostos fenólicos, eles foram observados na maioria dos extratos orgânicos e em alguns dos extratos aquosos. Plantas ricas em taninos são empregadas principalmente como anti-inflamatórias, anti-hipertensivas, para alívio de problemas gástricos, renais e urinários (de MELLO; SANTOS, 2017)

Pilatti e outros (2018), realizaram testes qualitativos das folhas de *C. fissilis*. O extrato metanólico indicou a presença de taninos condensados, chalconas/auronas, saponinas, esteróis/triterpenoides. Carminate et al. (2014), detectaram apenas a presença de taninos condensados no extrato hidroetanólico das folhas. Já no extrato das cascas, foram observados saponinas, fenóis, taninos hidrolisáveis e triterpenoides.

### 5.3 TESTES ANTIMICROBIANOS

A atividade antimicrobiana de extratos vegetais é comumente avaliada por métodos de difusão, como o método de difusão em poços ou difusão em discos, ou ainda por microdiluição em caldo (VALGAS et al., 2007). Na técnica de difusão em poços, o extrato é aplicado em pequenos poços, após a inoculação do microrganismo de interesse. Os compostos presentes no extrato se difundem pelo ágar e, se tiverem alguma propriedade antimicrobiana, o crescimento da cepa testada é inibido, formando um halo em torno do poço (BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016). A atividade dos extratos orgânicos contra as bactérias *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* e contra o fungo leveduriforme *Candida albicans* pela metodologia de difusão em poços, pode ser observada na Tabela 11. Nenhum dos extratos aquosos foi capaz de inibir os microrganismos nas concentrações testadas.

Tabela 11 – Atividade antimicrobiana dos extratos orgânicos do cedro pelo método de difusão em poços

Parte da planta	Extrato	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
Folhas	Hexano	-	-	-	-
	Ac. Etila	-	-	-	-
	Acetona	-	-	-	-
	Etanol	-	-	-	-
Pecíolos	Hexano	+	-	-	-
	Ac. Etila	-	-	-	-
	Acetona	-	-	-	-
	Etanol	-	-	-	-
Casca	Hexano	+	-	-	-
	Ac. Etila	-	-	-	-
	Acetona	++	++	++	-
	Etanol	++	-	+	-
Raízes	Hexano	-	-	-	-
	Ac. Etila	-	-	-	-
	Acetona	++	-	++	-
	Etanol	+	-	++	-
Controle negativo		-	-	-	-
Controle positivo		+++	+++	+++	+++

FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: - não houve formação de halo de inibição;  
 + houve formação de halo de inibição de até 2 mm;  
 ++ houve formação de halo de 2 a 7 mm;  
 +++ halo formado maior que 7 mm.

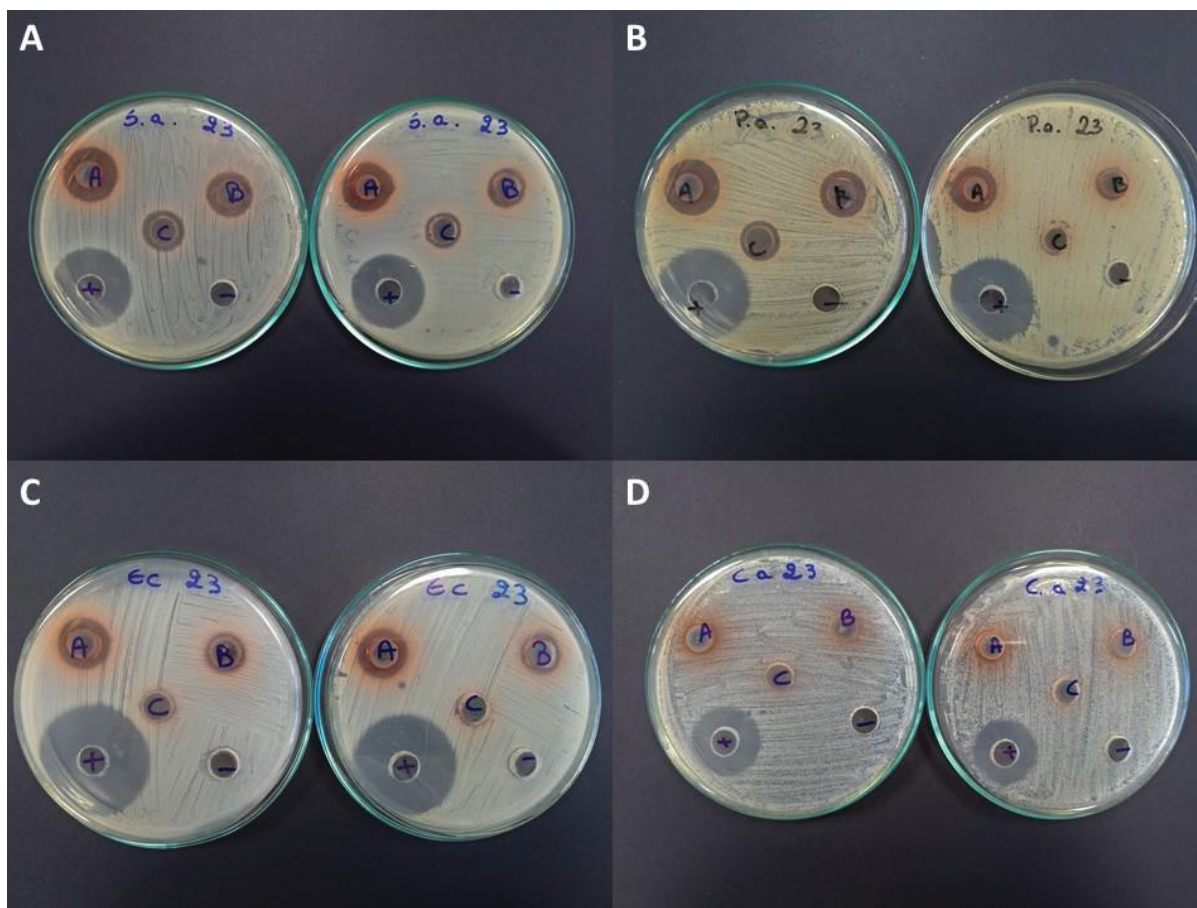
Nenhum dos extratos foi efetivo contra *C. albicans* nesta metodologia. Quanto às bactérias, alguns extratos demonstraram atividade contra *P. aeruginosa* e *S. aureus*, mas apenas o extrato acetônico das cascas foi capaz de inibir a bactéria Gram-negativa *E. coli*. Este foi o extrato mais ativo dentre os testados e seus halos de inibição podem ser observados na Figura 23. Este resultado é semelhante ao obtido por Carminate e outros (2014), que observaram que o extrato das cascas de *C. fissilis* foi efetivo contra *E. coli*, *S. aureus* e *B. cereus*.

Os extratos mais ativos contra os microrganismos foram os mais polares de cascas e raízes. É possível que esta atividade esteja relacionada com a presença de compostos fenólicos, detectados durante a caracterização, ou terpenos, já relatados na espécie (LEITE et al., 2005; AMBROZIN et al., 2006; LEITE et al., 2008).

O extrato hexânico das cascas exibiu atividade contra a bactéria Gram-positiva *S. aureus*. Outro trabalho constatou o mesmo resultado e associou esta atividade aos esteróis presentes no extrato (CORTEZ et al., 1998). Já os extratos

das folhas não inibiram nenhum dos microrganismos, como também foi observado por Carminate e outros (2014). No entanto, Lago e colaboradores (2004), retrataram que o óleo volátil das folhas possui atividade contra *S. aureus* e *E. coli*.

Figura 23 – Atividade do extrato acetônico das cascas do cedro frente a *E. coli* (A), *P. aeruginosa* (B), *S. aureus* (C) e *C. albicans* (D)



FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: Extrato testado nas concentrações 20, 10 e 5 mg/mL; Controle positivo gentamicina (0,1 mg/ml) para bactérias e nistatina (10.000UI/mL) para levedura; Controle negativo DMSO:água destilada (1:4).

Os extratos também foram testados para sua atividade antibacteriana pela metodologia de bioautografia. Nesta técnica, os extratos são aplicados em placas de CCD, nas quais pode ou não ser desenvolvida a cromatografia antes da execução da técnica. Posteriormente, as placas são imergidas em caldo contendo o microrganismo e incubadas em temperatura adequada para o crescimento. Após o tempo necessário para o desenvolvimento da bactéria ou fungo, as placas são aspergidas com uma solução de sal de tetrazólio, que permite a diferenciação entre as partes da placa de CCD onde houve crescimento normal dos microrganismos e

as partes onde o crescimento foi inibido pelos extratos. Isto é possível, pois o sal é convertido em um composto corado pelas enzimas desidrogenases dos microrganismos vivos, dessa forma, as zonas de inibição microbiana são identificadas por manchas claras em comparação ao fundo roxo, onde há crescimento normal (DEWANJEE et al., 2015; BALOUIRI; SADIKI; IBNSOUDA, 2016).

Nas Tabelas 12 e 13, podem ser observados os resultados da bioautografia dos extratos. Para obtenção destes resultados, os extratos foram apenas aplicados na placa de sílica gel, sem desenvolvimento da corrida cromatográfica. Alguns dos extratos apresentavam coloração bastante escura que impossibilitou a verificação da atividade por este método. Nesse caso, o resultado foi considerado como ausência de atividade.

Tabela 12– Inibição do crescimento de microrganismos pelos extratos orgânicos do cedro

Extrato		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
Folhas	Hexano	+	+	-	+
	Ac. Etila	+	+	+	++
	Acetona	+	+	+	++
	Etanol	+	+	+	++
Pecíolos	Hexano	+	-	+	+
	Ac. Etila	-	+	-	+
	Acetona	+	+	+	+
	Etanol	+	+	+	++
Casca	Hexano	+	+	+	++
	Ac. Etila	+	+	+	+
	Acetona	+	++	++	++
	Etanol	+	+	+	+++
Raízes	Hexano	+	+	+	+
	Ac. Etila	+	+	+	+
	Acetona	+	++	++	+
	Etanol	+	++	+	+

FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: - não houve formação de halo de inibição;  
 + houve formação de halo de inibição de até 2 mm;  
 ++ houve formação de halo de 2 a 7 mm;  
 +++ halo formado maior que 7 mm.

Tabela 13– Inibição do crescimento de microrganismos pelos extratos aquosos do cedro

Extrato		<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>C. albicans</i>
Folhas	Frio	-	-	-	-
	Decocção	-	-	-	-
	Infusão	-	-	-	-
Pecíolos	Frio	-	-	-	-
	Decocção	++	+	++	-
	Infusão	+	+	-	-
Casca	Frio	+	+	+	-
	Decocção	++	++	+	-
	Infusão	++	+	+	-
Raízes	Frio	+	+	+	-
	Decocção	++	+	+	+
	Infusão	+	+	+	+

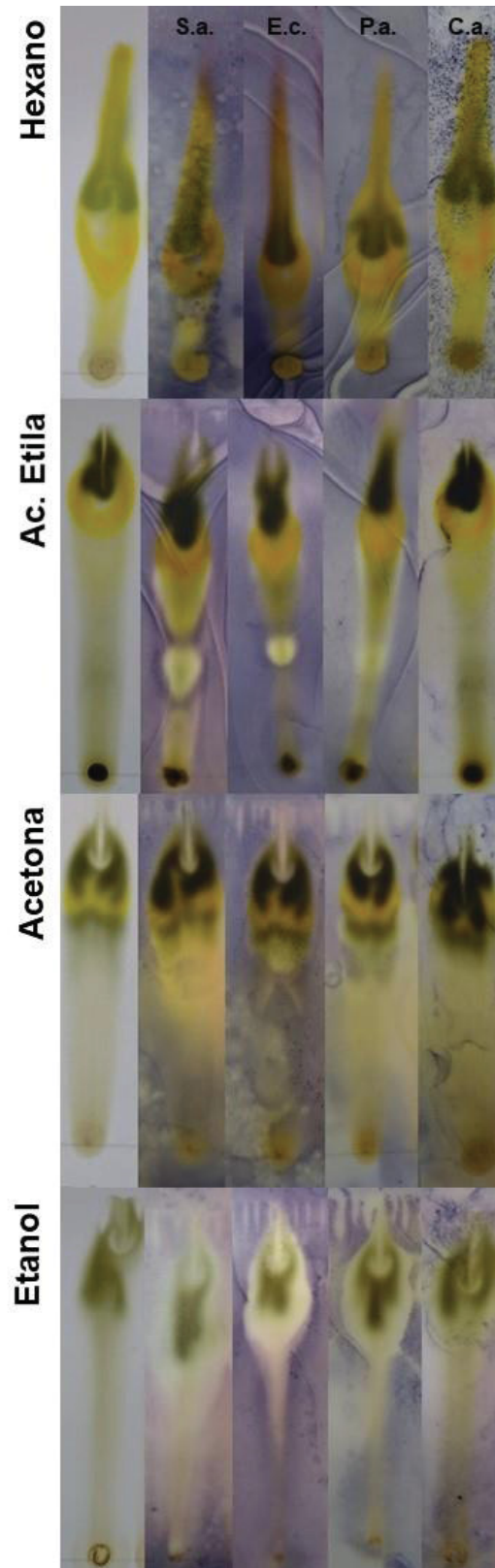
FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: - não houve formação de halo de inibição;  
 + houve formação de halo de inibição de até 2 mm;  
 ++ houve formação de halo de 2 a 7 mm;  
 +++ halo formado maior que 7 mm.

Os extratos também foram submetidos a bioautografia após o desenvolvimento da corrida cromatográfica para separação dos compostos. Para os extratos aquosos, este teste não permitiu novas conclusões, por isso, estes dados não foram mostrados. Os resultados dos extratos orgânicos podem ser observados nas Figuras 24, 25, 26 e 27.

Na comparação entre os resultados obtidos no método de difusão em poços com os obtidos pela bioautografia, é possível concluir que o segundo método foi mais sensível para a atividade dos extratos vegetais. Através do segundo método, todos os extratos orgânicos demonstraram atividade contra ao menos dois dos microrganismos, mesmo que sem a formação de halo de inibição, o que evidencia a sensibilidade do método para baixas atividades. O melhor exemplo disso são os resultados dos extratos contra *C. albicans*. No teste de difusão nenhum dos extratos havia inibido o crescimento, mas a bioautografia mostrou que todos os extratos orgânicos apresentam atividade, mesmo que baixa. Particularmente promissores são os resultados da casca contra a levedura, sendo o extrato etanólico o mais ativo, produzindo um halo de inibição de 10 mm. As cascas da *C. serrata* também demonstraram atividade contra *C. albicans*, sendo que das frações obtidas apenas a mais polar foi ativa (AHMAD et al., 2016).

Figura 24 – Bioautografia dos extratos orgânicos das folhas do cedro

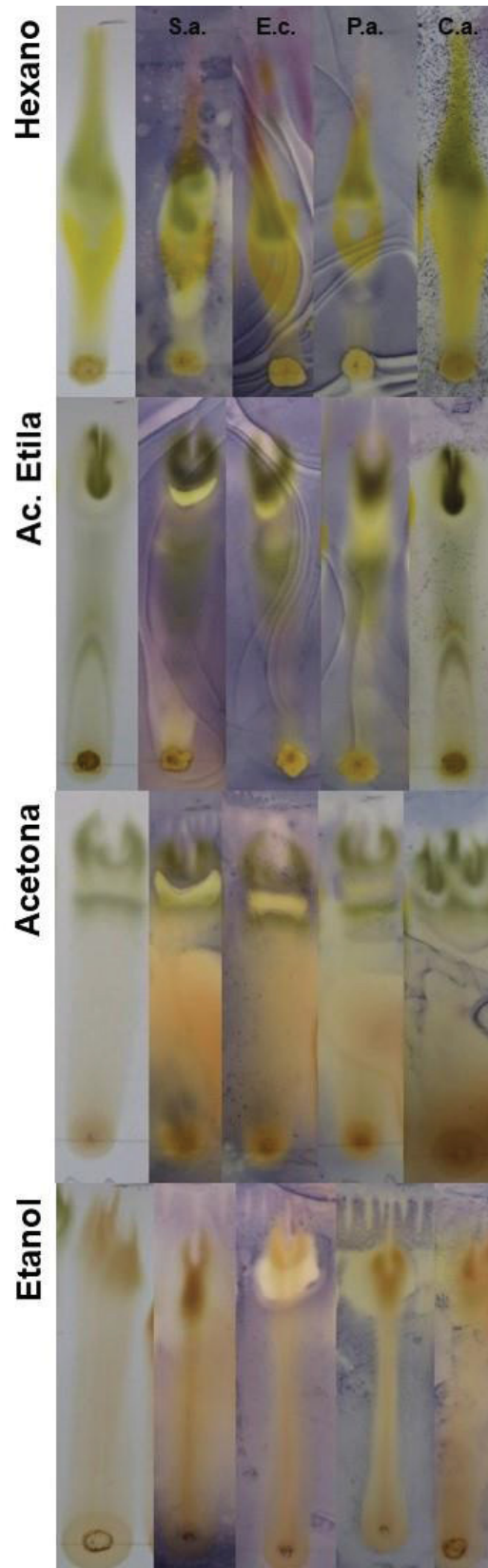


FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: S.a. *Staphylococcus aureus*; E.c. *Escherichia coli*; P.a. *Pseudomonas aeruginosa*; C.a. *Candida albicans*. Na esquerda, a CCD do mesmo extrato observada sob luz visível para comparação.



Figura 25 – Bioautografia dos extratos orgânicos dos pecíolos do cedro

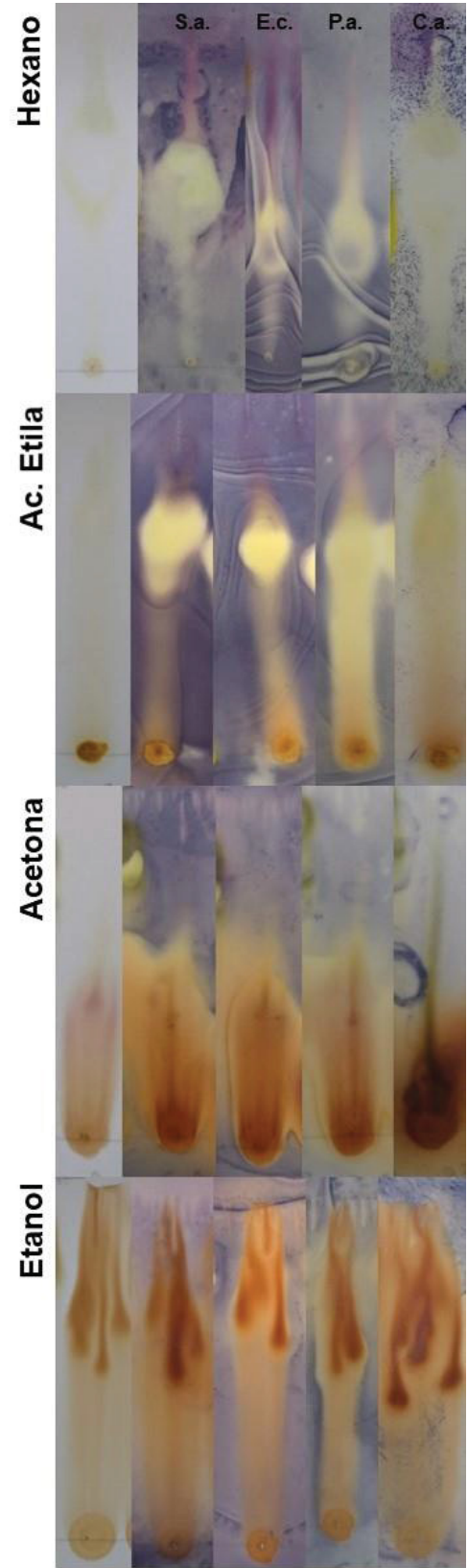


FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: S.a. *Staphylococcus aureus*; E.c. *Escherichia coli*; P.a. *Pseudomonas aeruginosa*; C.a. *Candida albicans*. Na esquerda, a CCD do mesmo extrato observada sob luz visível para comparação.



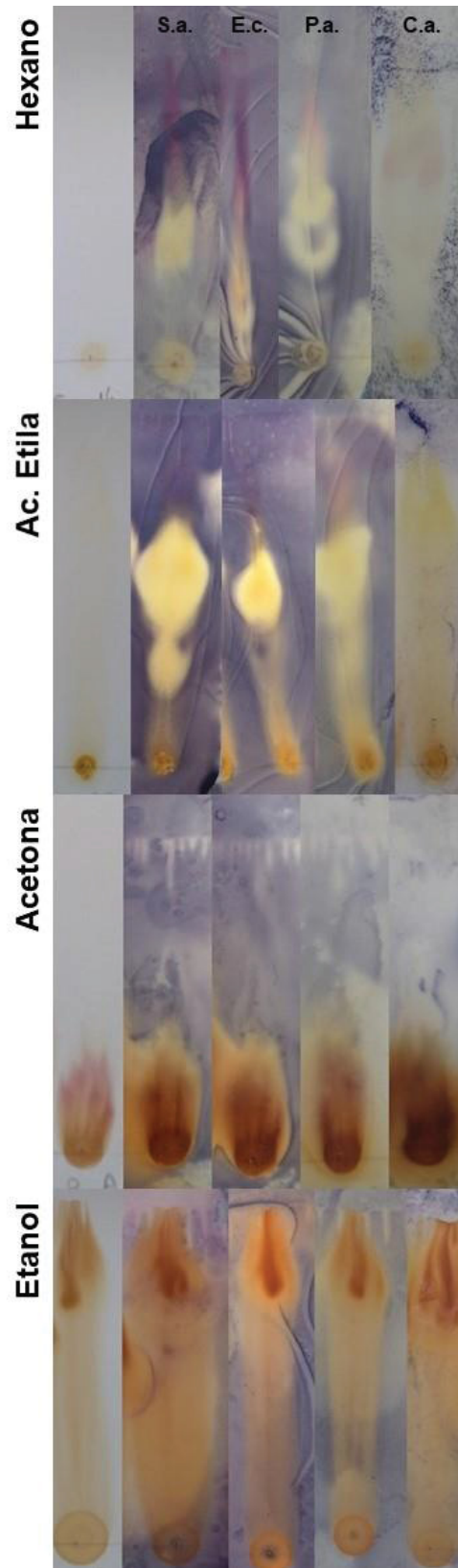
Figura 26 – Bioautografia dos extratos orgânicos das cascas do cedro



FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: S.a. *Staphylococcus aureus*; E.c. *Escherichia coli*; P.a. *Pseudomonas aeruginosa*; C.a. *Candida albicans*. Na esquerda, a CCD do mesmo extrato observada sob luz visível para comparação.

Figura 27 – Bioautografia dos extratos orgânicos das raízes do cedro



FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: S.a. *Staphylococcus aureus*; E.c. *Escherichia coli*; P.a. *Pseudomonas aeruginosa*; C.a. *Candida albicans*. Na esquerda, a CCD do mesmo extrato observada sob luz visível para comparação.

A levedura *C. albicans* é causadora de infecções dérmicas e nas mucosas em humanos, incluindo candidíase, uma infecção vaginal que causa corrimento (GULATI; NOBILE, 2016). As cascas do cedro são indicadas pela medicina popular para tratamento de corrimento vaginal (COLETTTO et al., 2010), o pode estar associado, além de outros mecanismos, à atividade antifúngica observada neste trabalho. Essa atividade pode estar relacionada a um composto presente no extrato em concentrações muito pequenas, que apenas pôde ser observada pela bioautografia.

Na difusão em poços, o único extrato que foi capaz de inibir as três bactérias foi o extrato acetônico das cascas. Na bioautografia, o resultado deste extrato se repetiu, somado a inibição de *C. albicans*. Dessa forma, o extrato acetônico das cascas demonstrou o melhor perfil de atividade antimicrobiana em ambas as metodologias. Na Figura 26, é possível observar que neste extrato não há manchas separadas com atividade, o extrato apresenta atividade como um todo. A identificação e o isolamento das substâncias responsáveis por esta atividade seriam de grande importância para a continuidade desta pesquisa.

A atividade dos extratos aquosos também não havia sido detectada pelo método de difusão em poços. Na bioautografia, o resultado se repetiu para os extratos das folhas e para extração a frio dos pecíolos. Mas este método também se mostrou mais sensível para a atividade dos extratos aquosos. Contra *S. aureus*, as decocções de cascas e raízes formaram halos de 4,2 mm e 4 mm, respectivamente. Inclusive, as extrações a quente das raízes foram capazes de uma pequena inibição contra *C. albicans*. O relato das atividades observadas nos extratos aquosos é importante, pois essas são as preparações mais utilizadas pela população para obter os benefícios das plantas medicinais.

Dentre os extratos aquosos, as maiores atividades foram observadas em extratos em que cumarinas foram identificadas pelo *screening*. As cumarinas já tiveram sua atividade antibacteriana e antifúngicas demonstradas, em especial as cumarinas com longas cadeia carbônicas em seus substituintes. A cumarina ostol, foi identificada em diferentes espécies de plantas e inibiu o crescimento de importantes fungos fitopatogênicos (VENUGOPALA; RASHMI; ODHAV, 2013). Grandivitina e agasilina foram isoladas das raízes de *Ferulago campestris* Grec. e demonstraram atividade contra nove cepas de bactérias (BASILE et al., 2009).

Na medicina tradicional, a casca do caule do cedro é indicada para tratar infecções bacterianas, infecções urinárias e condições inflamatórias (BOTSARIS, 2007; NUNES et al., 2007; COLETTTO et al., 2010). As atividades antibacterianas obtidas neste trabalho contribuem para embasar o uso medicinal das cascas, mas além disso, os resultados também apontam para o potencial das raízes. Contudo, este órgão da planta é pouco utilizado na medicina popular, provavelmente devido à dificuldade na coleta.

Além da verificação das propriedades medicinais das plantas, a investigação da atividade antibacteriana de extratos vegetais é importante tendo em vista a necessidade de novas moléculas antibióticas, uma vez que os microrganismos estão se tornando cada vez mais resistentes aos antibióticos em uso (CARMINATE et al., 2014). A grande diversidade química produzida pelo metabolismo secundário das plantas faz com que a biodiversidade da flora seja uma fonte de novas moléculas com as mais variadas atividades biológicas.

Outras espécies do gênero *Cedrela* demonstraram atividade contra diferentes microrganismos. As folhas de *C. toona* inibiram o crescimento de *Bacillus subtilis*, *S. aureus*, *E. coli*, *S. cerevisiae* (KHAN et al., 2014) e *N. gonorrhoeae* (SHOKEEN; BALA; TANDON, 2009). Cascas e folhas de *C. serrata* tiveram sua atividade atestada contra as bactérias Gram-positivas *S. aureus*, *B. subtilis* e contra as Gram-negativas *P. mirabilis*, *S. typhi*, *E. coli* e *Citrobacter* spp. (AHMAD et al., 2013). O óleo essencial das sementes de *C. sinensis* inibiu as bactérias *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* e *P. aeruginosa* (LIN et al., 2012). Os autores identificaram como principais componentes do óleo: 1,6-ciclododecadieno; 9,17-octadecadienal; Z,E-2,13-octadecadien-1-ol; 2,6,10-dodecatrien-1-ol, 3,7,11-trimetil-(Z,E)-acetato e antraceno.

Medini et al. (2014), testando a atividade antimicrobiana de *Limonium delicatulum* (Girard) Kuntze, demonstraram que os extratos hexânico e aquoso não inibiram os microrganismos testados. Os extratos hidroacetônico, hidrometanólico e hidroetanólico foram capazes de inibir o crescimento. Apesar da diferença entre os solventes de extração escolhidos e a planta avaliada, o trabalho mostra uma tendência que também foi observada no presente trabalho, de que as substâncias com atividades antibacterianas têm maior afinidade por sistemas de solventes mais polares.

Algumas moléculas usadas atualmente pela medicina como antibióticos apresentam a mesma característica. Por exemplo, segundo a Farmacopeia

Brasileira (BRASIL, 2010a) o sulfametoxazol é facilmente solúvel em acetona e a azitromicina é facilmente solúvel em etanol e metanol. Facilmente solúvel indica que um grama da substância é completamente solúvel em até 10 mL de solvente (BRASIL, 2010b). Além disso, o sulfametoxazol, a azitromicina e outros antibióticos comerciais possuem solubilidade muito baixa em água (BRASIL, 2010a). É possível que as moléculas presentes em extratos vegetais com atividade antibacteriana possuam alguma similaridade química com estes antibióticos, o que explicaria as menores atividades nos extratos aquosos e hexânicos.

A bioautografia após a corrida dos extratos traz informações adicionais sobre os compostos responsáveis pela atividade. É possível avaliar quais das manchas inibem o crescimento e, por comparação com as placas de CCD, é possível ter uma ideia do tipo de composto presente em determina mancha. Por exemplo, na bioautografia do extrato hexânico das folhas (Figura 24), há uma mancha próxima ao *spot* de aplicação que inibiu os quatro microrganismos. Através da CCD aspergida com anisaldeído sulfúrico, conclui-se que é possível que esta mancha seja um terpeno (As imagens do *screening* dos extratos orgânicos encontram-se no Apêndice 1). No extrato etanólico, a mancha superior também inibiu todos os microrganismos e o *screening* fitoquímico indicou que esta substância pode ser um terpeno ou um composto fenólico. É importante salientar que pode haver mais de uma substância na mesma mancha, uma vez que os extratos são quimicamente muito complexos. As diferentes substâncias podem atuar sinergicamente para a atividade observada, ou apenas uma substância pode ser ativa, ou ainda, as interações entre as diferentes moléculas podem resultar em inibição da atividade, o que poderia ser verificado com o isolamento.

Na Figura 25 encontram-se os resultados da bioautografia dos extratos dos pecíolos. Quanto ao extrato acetônico, na parte superior da placa, umas das manchas também teve um amplo espectro de inibição. O revelador para terpenos teve resultado positivo nesta mancha, mas o *screening* também demonstrou que pode tratar-se de uma cumarina.

As cascas extraídas com acetato de etila (Figura 26), demonstraram diferentes perfis de inibição contra os microrganismos. Algumas manchas inibiram todos os microrganismos e outras foram mais seletivas na atividade. Contra a bactéria *P. aeruginosa*, o extrato como um todo apresentou inibição, o que pode estar relacionado com a presença de compostos fenólicos, terpenos, cumarinas ou

taninos identificados no extrato. O extrato das raízes em acetato de etila (Figura 27) apresentou um perfil de atividade antimicrobiana semelhante ao mesmo extrato das cascas. Além disso, o perfil fitoquímico dos dois extratos também foi bastante similar, o que pode indicar compostos ativos comuns entre as duas partes.

Na comparação entre os testes microbianos e o *screening* fitoquímico, observamos alguns padrões entre os extratos ativos: terpenos, fenóis, cumarinas, antraquinonas e taninos estão presentes na maioria deles. Dentre os compostos fenólicos, os flavonoides, taninos, ácidos fenólicos e cumarinas são conhecidos por suas atividades antimicrobianas (PUUPPONEN-PIMIA et al., 2001; NOHYNEK et al., 2006; de CAMARGO et al., 2017). Estes compostos atuam por diversos mecanismos, por exemplo, a ação antimicrobiana dos taninos pode ocorrer pela inibição das enzimas bacterianas e fúngicas, pela ação sobre as membranas destes organismos ou por indisponibilizar íons essenciais ao metabolismo (CARMINATE et al., 2014).

Os terpenos também possuem atividades antimicrobianas bem documentadas (GALLUCCI et al., 2009; POPOVA et al., 2009). De acordo com Paduch et al. (2007), essa atividade está muito relacionada com o caráter lipofílico destas moléculas. Terpenos atuam principalmente causando alterações na membrana dos microrganismos, mas também podem reduzir a expressão de genes ligados a virulência ou levar a alteração na expressão de proteínas importantes (GREAY; HAMMER, 2015). Os terpenos são os metabólitos mais abundantes no gênero *Cedrela* (de LEO et al., 2018), podendo estar ligados às atividades antimicrobianas demonstradas pelo cedro neste trabalho. O óleo essencial das cascas de *C. odorata* foi ativo contra os microrganismos *B. cereus* e *A. niger*. O óleo era composto principalmente por sesquiterpenos (VILLANUEVA et al., 2009).

Na literatura consultada, nenhuma das moléculas isoladas do *C. fissilis* foi testada para sua atividade antifúngica ou antibacteriana, mas as atividades de algumas delas foram observadas quando isoladas de outras fontes. Por exemplo, o ácido oleanólico foi isolado das raízes (LEITE et al., 2005) e dos frutos do cedro (LEITE et al., 2008). É um triterpeno comumente encontrado em alimentos e plantas medicinais e teve sua atividade demonstrada contra diferentes bactérias (FONTANAY et al., 2008; WOLSKA et al., 2010). Além disso, o limonoide metil angolensato, isolado no cedro por Leite e colaboradores (2008), já havia demonstrado atividade antibacteriana contra *B. subtilis* e antifúngica contra *A. niger*



(CHIRUVELLA et al., 2007) e o sesquiterpeno  $\beta$ -cariofileno, presente nas folhas e cascas do caule (LAGO et al., 2004) inibiu o crescimento da bactéria *S. aureus* e apresentou atividade antifúngica superior ao controle positivo (DAHAM et al., 2015).

#### 5.4 TESTE ALELOPÁTICO

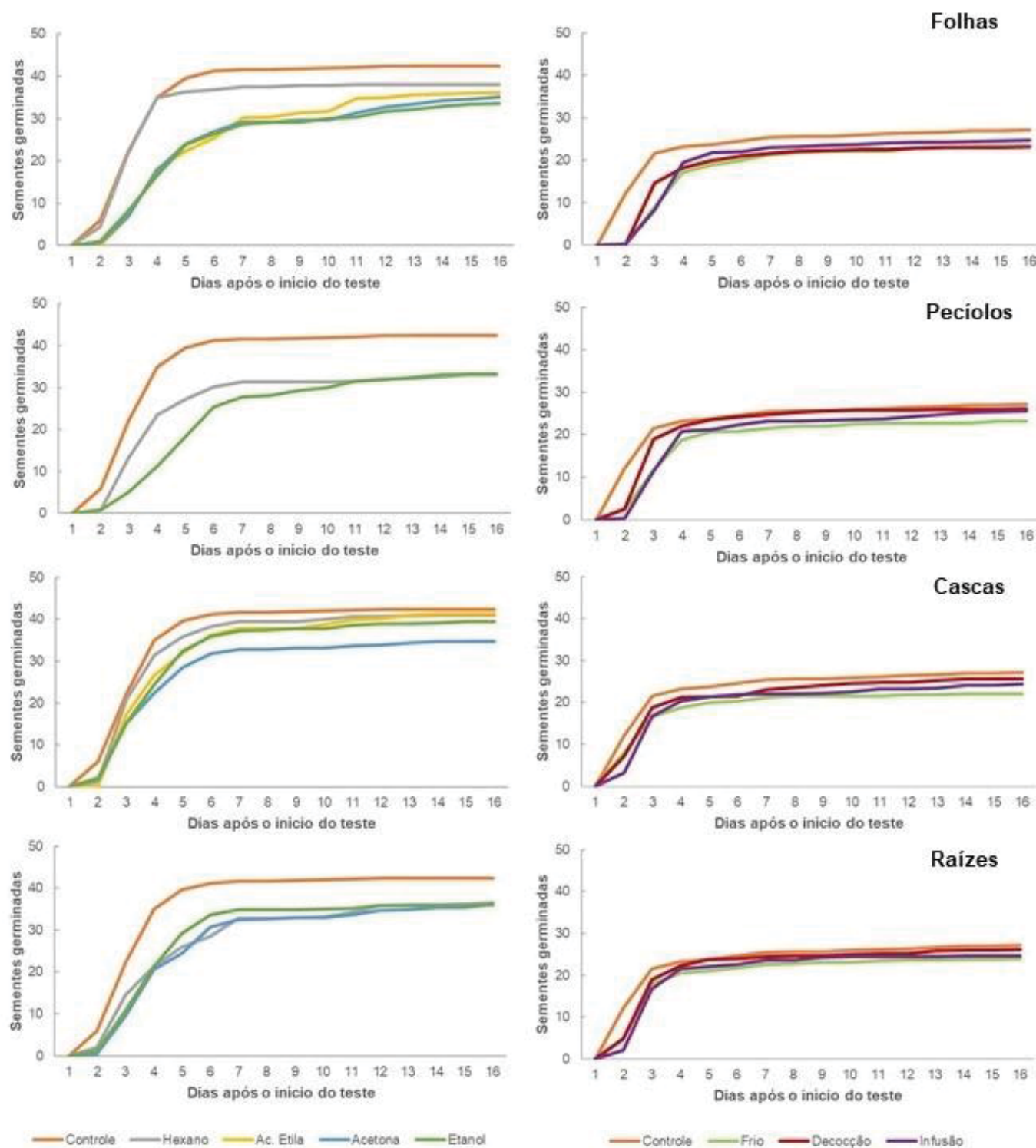
O potencial alelopático dos extratos de cedro foi mensurado através da avaliação da inibição do crescimento e da germinação da planta daninha *Ipomoea nil*. Para isto, as sementes foram colocadas em caixas Gerbox contendo cada um dos extratos a serem testados e as caixas foram acomodadas de forma aleatória em estufa de germinação com fotoperíodo. Por 15 dias, o número de sementes germinadas foi contado diariamente e os resultados encontram-se demonstrados na Figura 28, onde cada curva representa o somatório das sementes germinadas desde o início do teste.

Na Figura 28, cada curva representa a média de cinco repetições. É possível observar que nenhuma das curvas dos tratamentos foi superior ao controle, ou seja, nenhum dos extratos induziu uma germinação maior das sementes. Inclusive, o total de sementes germinadas no controle ao final do teste, foi superior a todos os tratamentos. De forma geral, a redução da germinação produzida pelos extratos orgânicos foi maior que a produzida pelos aquosos, sendo que os resultados podem ser melhor comparados através do índice de velocidade de germinação (IVG) e da porcentagem de germinação (%G), descritos na Tabela 14 para os extratos orgânicos e na Tabela 15, para os extratos aquosos. Além disso, as tabelas trazem os parâmetros de crescimento das plântulas obtidos no sétimo dia após a germinação.

Em relação aos resultados dos extratos aquosos, houve redução no valor do IVG em relação ao controle, o que indica que a presença dos extratos resultou em atraso na velocidade de germinação. Entretanto, em relação à porcentagem de germinação, não houve diferença significativa entre o controle e os tratamentos, ou seja, as sementes tratadas com os extratos aquosos levaram mais tempo para germinar, mas o total de sementes germinadas foi semelhante ao controle. Este atraso na germinação pode ter ocorrido em função da complexidade química dos extratos, que por si só pode causar um estresse às sementes.



Figura 28 – Total de sementes germinadas ao longo do teste de atividade alelopática com extratos do cedro



FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: Gráficos da esquerda referem-se aos extratos orgânicos, sendo o primeiro dos extratos orgânicos das folhas, em seguida pecíolos, cascas e, por fim, raízes. Gráficos da direita referem-se aos extratos aquosos, na mesma ordem. Os extratos de pecíolos em acetato de etila e acetona e das raízes em acetato de etila não foram testados para atividade alelopática devido à pequena disponibilidade de extrato bruto.

Tabela 14 –Teste alelopático dos extratos orgânicos (0,5% m/v) do cedro

Extrato	IVG	%G	CR	CPA	MF	MS
Controle	20,0 <sup>a</sup>	84,8 <sup>a</sup>	25,9 <sup>a</sup>	48,6 <sup>a</sup>	0,0894 <sup>a</sup>	0,0513 <sup>b</sup>
Folhas hexano	18,1 <sup>a</sup>	76,0 <sup>a</sup>	14,8 <sup>c</sup>	30,6 <sup>b</sup>	0,0730 <sup>b</sup>	0,0495 <sup>b</sup>
Folhas ac. etila	10,4 <sup>c</sup>	72,4 <sup>b</sup>	13,0 <sup>d</sup>	22,2 <sup>c</sup>	0,0607 <sup>c</sup>	0,0533 <sup>a</sup>
Folhas acetona	10,5 <sup>c</sup>	70,4 <sup>b</sup>	12,2 <sup>d</sup>	24,7 <sup>c</sup>	0,0629 <sup>c</sup>	0,0534 <sup>a</sup>
Folhas etanol	10,6 <sup>c</sup>	67,2 <sup>b</sup>	11,6 <sup>d</sup>	20,8 <sup>c</sup>	0,0568 <sup>c</sup>	0,0552 <sup>a</sup>
Pecíolos hexano	12,3 <sup>c</sup>	66,0 <sup>b</sup>	14,4 <sup>c</sup>	24,3 <sup>c</sup>	0,0607 <sup>c</sup>	0,0542 <sup>a</sup>
Pecíolos etanol	9,1 <sup>c</sup>	66,4 <sup>b</sup>	9,9 <sup>d</sup>	24,8 <sup>c</sup>	0,0587 <sup>c</sup>	0,0530 <sup>a</sup>
Cascas hexano	16,5 <sup>b</sup>	82,0 <sup>a</sup>	11,9 <sup>d</sup>	36,1 <sup>b</sup>	0,0736 <sup>b</sup>	0,0541 <sup>a</sup>
Cascas ac. etila	14,6 <sup>b</sup>	82,8 <sup>a</sup>	12,7 <sup>d</sup>	32,4 <sup>b</sup>	0,0717 <sup>b</sup>	0,0545 <sup>a</sup>
Cascas acetona	13,3 <sup>c</sup>	69,2 <sup>b</sup>	14,7 <sup>c</sup>	25,5 <sup>c</sup>	0,0645 <sup>c</sup>	0,0538 <sup>a</sup>
Cascas etanol	14,8 <sup>b</sup>	78,8 <sup>a</sup>	22,1 <sup>b</sup>	29,6 <sup>b</sup>	0,0706 <sup>b</sup>	0,0541 <sup>a</sup>
Raízes hexano	13,3 <sup>c</sup>	73,2 <sup>b</sup>	16,5 <sup>c</sup>	29,4 <sup>b</sup>	0,0681 <sup>c</sup>	0,0516 <sup>b</sup>
Raízes acetona	11,6 <sup>c</sup>	72,4 <sup>b</sup>	17,2 <sup>c</sup>	30,8 <sup>b</sup>	0,0675 <sup>c</sup>	0,0511 <sup>b</sup>
Raízes etanol	12,7 <sup>c</sup>	72,0 <sup>b</sup>	11,9 <sup>d</sup>	32,9 <sup>b</sup>	0,0711 <sup>b</sup>	0,0517 <sup>b</sup>
<b>CV (%)</b>	<b>18,45</b>	<b>11,58</b>	<b>17,31</b>	<b>16,03</b>	<b>13,06</b>	<b>4,08</b>

FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: IVG: Índice de velocidade de germinação; %G: Porcentagem de germinação; CR: Comprimento de radícula; CPA: Comprimento de parte aérea; MF: Massa fresca por plântula; MS: Massa seca. Letras diferentes representam diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ). Os extratos de pecíolos em acetato de etila e acetona e das raízes em acetato de etila não foram testados para atividade alelopática devido à massa de extrato bruto insuficiente.

Tabela 15 –Teste alelopático dos extratos aquosos do cedro

Extrato	IVG	%G	CR	CPA	MF	MS
Controle	18,0 <sup>a</sup>	54,4 <sup>a</sup>	37,5 <sup>c</sup>	59,2 <sup>b</sup>	0,0955 <sup>b</sup>	0,0556 <sup>a</sup>
Frio folhas	8,5 <sup>c</sup>	46,4 <sup>a</sup>	41,2 <sup>b</sup>	52,6 <sup>c</sup>	0,1002 <sup>b</sup>	0,0509 <sup>a</sup>
Frio pecíolos	10,2 <sup>c</sup>	46,4 <sup>a</sup>	53,4 <sup>a</sup>	71,6 <sup>a</sup>	0,1231 <sup>a</sup>	0,0526 <sup>a</sup>
Frio cascas	13,6 <sup>b</sup>	44,0 <sup>a</sup>	25,4 <sup>d</sup>	51,6 <sup>c</sup>	0,0914 <sup>b</sup>	0,0567 <sup>a</sup>
Frio raízes	12,9 <sup>b</sup>	48,0 <sup>a</sup>	23,3 <sup>d</sup>	44,9 <sup>c</sup>	0,0821 <sup>b</sup>	0,0530 <sup>a</sup>
Decocção folhas	9,5 <sup>c</sup>	46,4 <sup>a</sup>	34,2 <sup>c</sup>	46,5 <sup>c</sup>	0,0876 <sup>b</sup>	0,0535 <sup>a</sup>
Decocção pecíolos	12,6 <sup>b</sup>	52,4 <sup>a</sup>	35,2 <sup>c</sup>	57,2 <sup>b</sup>	0,1009 <sup>b</sup>	0,0517 <sup>a</sup>
Decocção cascas	14,4 <sup>b</sup>	51,2 <sup>a</sup>	35,0 <sup>c</sup>	45,7 <sup>c</sup>	0,0860 <sup>b</sup>	0,0526 <sup>a</sup>
Decocção raízes	13,6 <sup>b</sup>	52,4 <sup>a</sup>	30,8 <sup>c</sup>	56,6 <sup>b</sup>	0,0988 <sup>b</sup>	0,0531 <sup>a</sup>
Infusão folhas	9,1 <sup>c</sup>	49,6 <sup>a</sup>	44,5 <sup>b</sup>	57,5 <sup>b</sup>	0,1078 <sup>a</sup>	0,0561 <sup>a</sup>
Infusão pecíolos	9,7 <sup>c</sup>	51,2 <sup>a</sup>	47,0 <sup>b</sup>	66,1 <sup>a</sup>	0,1224 <sup>a</sup>	0,0550 <sup>a</sup>
Infusão cascas	11,8 <sup>c</sup>	48,8 <sup>a</sup>	28,4 <sup>d</sup>	51,7 <sup>c</sup>	0,0944 <sup>b</sup>	0,0505 <sup>a</sup>
Infusão raízes	11,5 <sup>c</sup>	49,2 <sup>a</sup>	33,8 <sup>c</sup>	57,6 <sup>b</sup>	0,1026 <sup>b</sup>	0,0500 <sup>a</sup>
<b>CV (%)</b>	<b>16,82</b>	<b>14,34</b>	<b>18,57</b>	<b>15,70</b>	<b>12,42</b>	<b>8,41</b>

FONTE: A autora (2019).

LEGENDA: IVG: Índice de velocidade de germinação; %G: Porcentagem de germinação; CR: Comprimento de radícula; CPA: Comprimento de parte aérea; MF: Massa fresca por plântula; MS: Massa seca. Letras diferentes representam diferença significativa entre as médias, de acordo com o teste de Scott-Knott ( $p < 0,05$ ).

Ainda se tratando de extratos aquosos, o parâmetro massa seca por planta não foi alterado pela presença dos extratos. Quanto a massa fresca, todos os extratos tiveram resultados iguais ou superiores ao controle. Já nos comprimentos de raiz e parte aérea, os resultados foram variados, alguns extratos induziram o crescimento de radícula e/ou parte aérea, outros reprimiram o crescimento e outros ainda, não diferiram significativamente do controle. As extrações a frio e por infusão dos pecíolos resultaram em aumento de tamanho e de massa fresca das plântulas em relação ao controle, o que leva a conclusão de que os compostos presentes nesses extratos induziram o crescimento das plantas. Mas o mesmo não foi observado na extração por decocção dos pecíolos, os resultados deste extrato foram semelhantes ao controle, o que indica que os compostos que levaram a indução do crescimento nos outros extratos podem ter sido degradados pela maior temperatura.

Além da redução da velocidade de germinação observada em todos os extratos, apenas três extratos aquosos reduziram o crescimento de raiz e parte aérea simultaneamente, sendo os extratos das cascas a frio e por infusão e das raízes a frio. Isso indica que, de forma geral, as cascas tiveram os resultados mais promissores de atividade alelopática entre as extrações com água, ainda que sua inibição tenha sido pequena. Diferentemente destes resultados, Gomaa et al. (2014) obtiveram resultados muito promissores com o extrato aquoso de *Sonchus oleraceus* L. Os extratos inibiram cinco espécies de plantas, incluindo a própria *S. oleraceus* e foram efetivos em várias concentrações.

Em relação aos extratos orgânicos, a maioria dos tratamentos promoveu redução na porcentagem de sementes germinadas e no índice de velocidade de germinação. As exceções foram o extrato hexânico das folhas que não apresentou diferença significativa com o controle nos dois parâmetros de germinação e três dos extratos das cascas que exibiram redução no IVG, mas não na porcentagem de germinação. Esse resultado indica que a maioria dos extratos foi capaz de inibir a germinação em algum grau.

A massa seca é um parâmetro que verifica a eficiência de assimilação de carbono pela planta, ou seja, qual a interferência dos extratos sobre o metabolismo fotossintético. Nesse parâmetro, os extratos foram estatisticamente semelhantes ao controle ou superiores. Isso indica que nenhum dos extratos inibiu a assimilação de carboidratos. Todavia, os parâmetros comprimento de radícula, comprimento de parte aérea e massa fresca foram afetados por todos os extratos orgânicos testados.

Esses parâmetros estão diretamente relacionados ao crescimento das plântulas, indicando que todos os extratos reduziram o crescimento da planta daninha. Os resultados mais promissores foram obtidos pelos três extratos orgânicos das raízes, uma vez que reduziram os parâmetros ligados a germinação das sementes e induziram a redução do crescimento das plântulas germinadas, sem aumentar o acúmulo de massa seca, com outros extratos fizeram.

A interferência dos extratos do cedro observadas neste trabalho sobre o sistema radicular acarretada por todos os extratos orgânicos e por alguns dos extratos aquosos é um dos indícios mais importantes do potencial fitotóxico de um extrato vegetal. Isso ocorre, pois as raízes são a parte mais sensível a atividade de compostos alelopáticos ou fitotóxicos. Os aleloquímicos interferem nas divisões celulares, danificam a membrana e outras estruturas, prejudicando o crescimento do sistema radicular (RADHAKRISHNAN; ALQARAWI; ABD\_ALLAH, 2018).

As moléculas isoladas no cedro indicam que esta espécie apresenta uma grande diversidade de terpenos. Além disso, a presença de terpenos foi constatada através do *screening* em todos os extratos do cedro, sejam aquosos ou orgânicos. Estes compostos podem estar relacionados com a atividade alelopática observada, já que compostos terpênicos com alto potencial aleloquímico já foram relatados, como por exemplo a artemisinina, um sesquiterpeno fitotóxico, que atua sobre vários processos metabólicos da planta, incluindo redução do crescimento radicular (MACÍAS et al., 2001; DUKE; OLIVA, 2004).

Além disso, também foram identificados compostos fenólicos, cumarinas e taninos em alguns dos extratos. De acordo com Einhellig (2004), estas classes de compostos fenólicos, juntamente com alguns flavonoides, também possuem atividades alelopáticas demonstradas. Fenóis com potencial aleloquímico podem atuar sobre as membranas celulares, resultando em mudanças de permeabilidade que interferem em vários processos importantes da célula. Além disso, interferem nos padrões de biossíntese de proteínas, hormônios e metabólitos das plantas (EINHELLIG, 2004). Li et al. (1993) observaram a atividade de uma cumarina sobre a germinação e crescimento de sementes de alface, além disso, esse composto fenólico também inibiu o alongamento da raiz como os extratos orgânicos neste trabalho.

O cedrelanolide, um limonoide isolado das cascas de *C. salvadorensis*, demonstrou atividade alelopática contra *L. multiflorum* var. *Hercules*, *T. vulgare* var.

*Salamanca*, *P. ixocarpa* e *T. alexandrinum*. O composto inibiu a germinação e a respiração das sementes, acarretando redução no peso seco das plântulas germinadas (CÉSPEDES et al., 2001). Além disso, compostos extraídos da madeira de *C. ciliolata* se mostraram bons inibidores de crescimento e de germinação das plantas *L. multiflorum*, *T. alexandrinum*, *P. ixocarpa*, *T. vulgare* (CÉSPEDES et al., 1999).

A resistência aos herbicidas em uso atualmente vem crescendo ano após ano (WALLER, 2004), o que evidencia a necessidade da busca por novas moléculas ativas. Nesse sentido, as plantas produzem uma grande diversidade de compostos que apresentam as mais diversas atividades biológicas, incluindo a inibição da germinação e do crescimento de plantas daninhas (RADHAKRISHNAN; ALQARAWI; ABD\_ALLAH, 2018). Extratos vegetais e óleos essenciais de diversas plantas, além de substâncias isoladas deles, já demonstraram potencial alelopático e fitotóxico (GOMAA et al., 2014; MENDES; REZENDE, 2014; AHUJA et al., 2015; ANESE et al., 2015; FOUAD et al., 2015), incluindo os resultados aqui demonstrados pelos extratos orgânicos do cedro, em especial as suas raízes.

## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A presença de terpenos/esteróis e compostos fenólicos foi observada em todos os extratos. Além da detecção de antraquinonas, cumarinas e taninos na maioria deles. Flavonoides foram detectados apenas em alguns dos extratos, ainda assim em baixas concentrações. A quantificação de compostos fenólicos revelou que as extrações aquosas e orgânicas mais polares foram mais efetivas para extrair esse tipo de composto. As mesmas extrações demonstram as maiores atividades antioxidantes, indicando que esta atividade tem alguma relação com a concentração de compostos fenólicos.

Nos testes antimicrobianos, verificou-se que a metodologia de bioautografia foi mais sensível para a atividade dos extratos. Todas as partes demonstraram alguma atividade contra *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* e *C. albicans*, sendo as atividades mais marcantes apresentadas pelos extratos orgânicos. Alguns dos extratos foram capazes de inibir os quatro microrganismos testados, sendo que o extrato acetônico das cascas foi considerado o mais ativo. A atividade antimicrobiana demonstrada pode estar ligada aos usos do cedro na medicina popular. As perspectivas futuras do projeto envolvem estudos mais aprofundados da atividade antimicrobiana dos extratos, além do isolamento e identificação dos compostos responsáveis por esta atividade.

A pouca massa de extrato bruto obtida nas extrações orgânicas foi um fator limitante em algumas etapas do estudo. Em virtude disso, alguns dos extratos não puderam ser testados para atividade alelopática e não foi possível testar a atividade dos extratos sobre outras plantas daninhas, para verificar a reprodutibilidade dos resultados. Apesar disso, os extratos orgânicos do cedro foram capazes de reduzir a germinação e crescimento da planta daninha *I. nil*, em especial o alongamento da raiz, sendo este um importante indicativo de potencial alelopático. Os resultados mais promissores foram observados nos extratos das raízes do cedro.

A biodiversidade da flora paranaense ainda se encontra pouco caracterizada, mas pode ser fonte de moléculas ativas de interesse farmacêutico e agrícola. Isso foi comprovado neste trabalho, onde os extratos do cedro (*Cedrela fissilis* Vell.), espécie nativa da Mata Atlântica, demonstraram seu potencial antimicrobiano e alelopático.



## REFERÊNCIAS

- AERTS, R. J.; MORDUE, A. J. Feeding deterrence and toxicity of neem triterpenoids. **Journal of Chemical Ecology**, v. 23, n. 9, p. 2117–2132, 1997.
- AHMAD, R. et al. Antioxidant, antilglycation and antimicrobial activities of *Ziziphus oxyphylla* and *Cedrela serrata* extracts. **European Journal of Medicinal Plants**, v. 3, n. 4, p. 520-529, 2013.
- AHMAD, R. et al. Anti-infective, cytotoxic and antioxidant activity of *Ziziphus oxyphylla* and *Cedrela serrata*. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 8, p. 671–676, 2016.
- AHUJA, N. et al. Herbicidal activity of eugenol towards some grassy and broad-leaved weeds. **Journal of Pest Science**, v. 88, n. 1, p. 209–218, 2015.
- ALMONTE-FLORES, D. C. et al. Pharmacological and genotoxic properties of polyphenolic extracts of *Cedrela odorata* L. and *Juglans regia* L. barks in rodents. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1–8, 2015.
- ALVES, E. P. et al. Antimicrobial and antiproliferative activity of *Bauhinia forficata* Link and *Cnidioscolus quercifolius* extracts commonly used in folk medicine. **The Journal of Contemporary Dental Practice**, v. 18, n. 8, p. 635–640, 2017.
- AMBROZIN, A. R. P. et al. Limonoids from andiroba oil and *Cedrela fissilis* and their insecticidal activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 17, n. 3, 2006.
- AMIGO-BENAVENT, M. et al. Antiproliferative and cytotoxic effects of green coffee and yerba mate extracts, their main hydroxycinnamic acids, methylxanthine and metabolites in different human cell lines. **Food and Chemical Toxicology**, v. 106, p. 125–138, 2017.
- AMIRA, E. A. et al. Effects of the ripening stage on phenolic profile, phytochemical composition and antioxidant activity of date palm fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, n. 44, p. 10896–10902, 2012.
- ANESE, S. et al. Bioherbicidal activity of drimane sesquiterpenes from *Drimys brasiliensis* Miers roots. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 28–35, 2015.
- ATANASOV, A. G. et al. Discovery and resupply of pharmacologically active plant-derived natural products: A review. **Biotechnology Advances**, v. 33, n. 8, p. 1582–1614, 2015.
- AZMIR, J. et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 4, p. 426–436, 2013.



BAK, M.-J. et al. *Cedrela sinensis* leaves suppress oxidative stress and expressions of iNOS and COX-2 via MAPK signaling pathways in RAW 264.7 cells. **Preventive Nutrition and Food Science**, v. 14, n. 4, p. 269–276, 2009.

BAK, M.-J. et al. Stimulation of activity and expression of antioxidant enzymes by solvent fractions and isolated compound from *Cedrela sinensis* leaves in HepG2 cells. **Journal of Medicinal Food**, v. 14, n. 4, p. 405–412, 2011.

BALICK, M. J.; MENDELSON, R. Assessing the economic value of traditional medicines from tropical rain forests. **Conservation Biology**, v. 6, n. 1, p. 128–130, 1992.

BALOUIRI, M.; SADIKI, M.; IBNSOUDA, S. K. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 6, n. 2, p. 71–79, 2016.

BARBOSA, E. G.; PIVELLO, V. R.; MEIRELLES, S. T. Allelopathic evidence in *Brachiaria decumbens* and its potential to invade the Brazilian cerrados. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 51, n. 4, p. 825–831, 2008.

BASILE, A. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of coumarins from the roots of *Ferulago campestris* (Apiaceae). **Molecules**, v. 14, n. 3, p. 939–952, 2009.

BASTIANETTO, S.; MÉNARD, C.; QUIRION, R. Neuroprotective action of resveratrol. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease**, v. 1852, n. 6, p. 1195–1201, 2015.

BENENCIA, F. et al. Immunomodulatory activities of *Cedrela tubiflora* leaf aqueous extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 49, n. 3, p. 133–139, 1995.

BERNARDES, L. S. C. et al. Produtos naturais e o desenvolvimento de fármacos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017, p. 107–128.

BLUM, U. Fate of phenolic allelochemicals in soils – the role of soil and rhizosphere microorganisms. In: MACÍAS, F. A. et al. **Allelopathy: Chemistry and mode of action of allelochemicals**. CRC Press, 2004. p. 57–76.

BOLSON, M. et al. Ethno-medicinal study of plants used for treatment of human ailments, with residents of the surrounding region of forest fragments of Paraná, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 161, p. 1–10, 2015.

BOLZANI, V. da S.; FLAUSINO JR, O.; VALLI, M. Biodiversidade brasileira: Uma fonte potencial de agentes terapêuticos ainda inexplorada. In: YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 5. ed. Itajaí: Univali, 2016, p. 421–458.

BOTSARIS, A. S. Plants used traditionally to treat malaria in Brazil: the archives of Flora Medicinal. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 3, n. 1, p. 18, 2007.

BRANCO, C. dos S. et al. Anticonvulsant, neuroprotective and behavioral effects of organic and conventional yerba mate (*Ilex paraguariensis* St. Hil.) on pentylenetetrazol-induced seizures in Wistar rats. **Brain Research Bulletin**, v. 92, p. 60–68, 2013.

BRANDÃO, M. das G. L. Importância dos registros históricos na investigação e utilização de produtos naturais. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017, p. 29-38.

BRASIL. Ministério de Agricultura e Reforma Agrária. **Regras para análise de sementes**. Brasília: SNAD/DNV/CLAV, 1992.

BRASIL. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 221, 23 jun. 2006. Seção 1, p. 2.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Portaria interministerial nº 2.960, de 9 de dezembro de 2008**. Aprova o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília, DF, 9 dez. 2008.

BRASIL. Diretoria Administrativa Financeira. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Ministério da Saúde. **RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. Brasília, DF, fev. 2009.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Fundação Oswaldo Cruz. **Farmacopeia Brasileira**: Volume 2. 5. ed. Brasília: Anvisa, 2010a.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Fundação Oswaldo Cruz. **Farmacopeia Brasileira**: Volume 1. 5. ed. Brasília: Anvisa, 2010b.

BRASIL. Lei nº 13.123, de 20 de maio de 2015. Regulamenta o inciso II do § 1º e o § 4º do art. 225 da Constituição Federal, o Artigo 1, a alínea j do Artigo 8, a alínea c do Artigo 10, o Artigo 15 e os §§ 3º e 4º do Artigo 16 da Convenção sobre Diversidade Biológica, promulgada pelo Decreto nº 2.519, de 16 de março de 1998; dispõe sobre o acesso ao patrimônio genético, sobre a proteção e o acesso ao conhecimento tradicional associado e sobre a repartição de benefícios para conservação e uso sustentável da biodiversidade; revoga a Medida Provisória nº 2.186-16, de 23 de agosto de 2001; e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, n. 95, 21 mai. 2015. Seção 1, p. 1.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Memento Fitoterápico da Farmacopeia Brasileira**. Brasília: ANVISA, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Informações Sistematizadas da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS: *Lippia sidoides* Cham., Verbenaceae - Alecrim-pimenta**. Brasília: Ministério da Saúde, 2018a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Informações Sistematizadas da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS: *Eucalyptus globulus* Labill. - Eucalipto.** Brasília: Ministério da Saúde, 2018b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Informações Sistematizadas da Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS: *Mikania glomerata* Spreng., Asteraceae - Guaco.** Brasília: Ministério da Saúde, 2018c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica e Insumos Estratégicos. **Relação Nacional de Medicamentos Essenciais: RENAME 2018.** Brasília: Ministério da Saúde, 2018d.

CAI, Y. et al. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Sciences**, v. 74, n. 17, p. 2157–2184, 2004.

de CAMARGO, A. C. et al. Phenolic acids and flavonoids of peanut by-products: Antioxidant capacity and antimicrobial effects. **Food Chemistry**, v. 237, p. 538–544, 2017.

CARMINATE, B. et al. Investigação antibacteriana *in vitro* de extratos etanólicos das folhas e cascas de *Cedrela fissilis* Vell. **Ciência e Natura**, Santa Maria, v. 36, Ed. Especial, p. 335–340, 2014.

CARVALHO, F. P. et al. The allelopathic effect of eucalyptus leaf extract on grass forage seed. **Planta Daninha**, v. 33, n. 2, p. 193–201, 2015.

de CASTRO, M. D. L.; PRIEGO-CAPOTE, F. Soxhlet extraction: Past and present panacea. **Journal of Chromatography A**, v. 1217, n. 16, p. 2383–2389, 2010.

CEREMPEI, A. et al. Dyeing and antibacterial properties of aqueous extracts from quince (*Cydonia oblonga*) leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 94, p. 216–225, 2016.

CÉSPEDES, C. L. et al. Phytochemical properties of limonoids isolated from *Cedrela ciliolata*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 25, n. 12, p. 2665–2676, 1999.

CÉSPEDES, C. L. et al. Growth inhibitory effects on fall armyworm *Spodoptera frugiperda* of some limonoids isolated from *Cedrela* spp. (Meliaceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, n. 5, p. 1903–1908, 2000.

CÉSPEDES, C. L. et al. Plant-growth inhibitory activity of cedrelanolide from *Cedrela salvadorensis*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 27, n. 1, p. 137–149, 2001.

CHANG, C.-C. et al. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 10, n. 3, p. 178-182, 2002.

CHANG, T.-S. An updated review of tyrosinase inhibitors. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, n. 6, p. 2440–2475, 2009.

CHIRUVELLA, K. K. et al. Phytochemical and antimicrobial studies of methyl angolensate and luteolin-7-O-glucoside isolated from callus cultures of *Soymida febrifuga*. **International Journal of Biomedical Science: IJBS**, v. 3, n. 4, p. 269–278, 2007.

CIURA, K. et al. Thin layer chromatography in drug discovery process. **Journal of Chromatography A**, v. 1520, p. 9–22, 2017.

COLETTTO, L. M. M. et al. **Plantas medicinais**: Nativas dos remanescentes florestais do oeste do Paraná. 1. ed. Foz do Iguaçu: Itaipu Binacional, 2010.

CORDER, R. et al. Endothelin-1 synthesis reduced by red wine. **Nature**, v. 414, n. 6866, p. 863–864, 2001.

CORNES, D. **Callisto**: a very successful maize herbicide inspired by allelochemistry. 6th triennial conference Maize Association of Australia. 2006. Disponível em: <[http://www.maizeaustralia.com.au/events\\_files/Callisto%20Herbicide%20-%20D%20Comes.pdf](http://www.maizeaustralia.com.au/events_files/Callisto%20Herbicide%20-%20D%20Comes.pdf)>. Acesso em: 21 ago. 2019.

CORSON, T. W.; CREWS, C. M. Molecular understanding and modern application of traditional medicines: Triumphs and trials. **Cell**, v. 130, n. 5, p. 769–774, 2007.

CORTEZ, D. A. G. et al. Atividade antibacteriana de extratos do caule de *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae). **Acta Scientiarum**, v. 20, n. 2, p. 243-245, 1998.

CRAGG, G. M.; GROTHAUS, P. G.; NEWMAN, D. J. New horizons for old drugs and drug leads. **Journal of Natural Products**, v. 77, n. 3, p. 703–723, 2014.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 1830, n. 6, p. 3670–3695, 2013.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Biodiversidade: Um componente essencial na descoberta de fármacos. In: YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 5. ed. Itajaí: Univali, 2016, p. 57-86.

CRAIG, M. I.; BENENCIA, F.; COULOMBIÉ, F. C. Antiviral activity of an acidic polysaccharides fraction extracted from *Cedrela tubiflora* leaves. **Fitoterapia**, v. 72, n. 2, p. 113–119, 2001.

da CUNHA, A. M. et al. Hypoglycemic activity of dried extracts of *Bauhinia forficata* Link. **Phytomedicine**, v. 17, n. 1, p. 37–41, 2010.

CURCIO, S. A. F. et al. Hypoglycemic effects of an aqueous extract of *Bauhinia forficata* on the salivary glands of diabetic mice. **Pakistan journal of pharmaceutical sciences**, v. 25, n. 3, p. 493-499, 2012.

DAHAM, S. et al. The anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene  $\beta$ -caryophyllene from the essential oil of *Aquilaria crassna*. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 11808–11829, 2015.

DEWANJEE, S. et al. Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. **Journal of Pharmaceutical Analysis**, v. 5, n. 2, p. 75–84, 2015.

DIAZ-GEREVINI, G. T. et al. Beneficial action of resveratrol: How and why? **Nutrition**, v. 32, n. 2, p. 174–178, 2016.

DO, Q. D. et al. Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 22, n. 3, p. 296–302, 2014.

DOMÍNGUEZ, X. A.; ALCORN, J. B. Screening of medicinal plants used by huastec mayans of northeastern Mexico. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 13, n. 2, p. 139–156, 1985.

DREW, L. Making tea. **Nature**, v. 566, n. 7742, p. S2–S4, 2019.

DUKE, S. O.; OLIVA, A. Mode of action of phytotoxic terpenoids. In: MACÍAS, F. A. et al. **Allelopathy: Chemistry and mode of action of allelochemicals**. CRC Press, 2004. p. 201-216.

DÜSMAN, E. et al. Antimutagenic effect of medicinal plants *Achillea millefolium* and *Bauhinia forficata* in vivo. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1–6, 2013.

DUTRA, R.; LEITE, M.; BARBOSA, N. Quantification of phenolic constituents and antioxidant activity of *Pterodon emarginatus* Vogel seeds. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 4, p. 606–614, 2008.

ECKER, A. et al. High-sucrose diet induces diabetic-like phenotypes and oxidative stress in *Drosophila melanogaster*: Protective role of *Syzygium cumini* and *Bauhinia forficata*. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 89, p. 605–616, 2017.

EINHELLIG, F. A. Mechanism of action of allelochemicals in allelopathy. In: INDERJIT; DAKSHINI, K. M. M.; EINHELLIG, F. A.; **Allelopathy**. Washington, DC: American Chemical Society, v. 582, 1994, p.96–116.

EINHELLIG, F. A. Mode of allelochemical action of phenolic compounds. In: MACÍAS, F. A. et al. **Allelopathy: Chemistry and mode of action of allelochemicals**. CRC Press, 2004. p. 217-238.

EISENSTEIN, M. Tea for tumours. **Nature**, v. 566, n. 7742, p. S6–S7, 2019.

ENCYCLOPEDIA of Life. Disponível em: <<https://eol.org/>>. Acesso em: 30 ago. 2019.

FABRICANT, D. S.; FARNSWORTH, N. R. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. **Environmental Health Perspectives**, v. 109, n. suppl 1, p. 69–75, 2001.

FALKENBERG, M. de B. Quinonas. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017, p. 249-269.

FARINA, V.; BROWN, J. D. Tamiflu: The supply problem. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 45, n. 44, p. 7330–7334, 2006.

FARNSWORTH, N. R. et al. Medicinal plants in therapy. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 63, n. 6, p. 965–981, 1985.

FERREIRA, D. F. Sisvar: A guide for its bootstrap procedures in multiple comparisons. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 38, n. 2, p. 109–112, 2014.

FINTELMANN, V.; WEISS, R. F. **Manual de Fitoterapia**. 11 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

FIRN, R. D.; JONES, C. G. Natural products - a simple model to explain chemical diversity. **Natural Product Reports**, v. 20, n. 4, p. 382, 2003.

FLORA Digital. Disponível em: <<http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/index.php?pag=apresenta.php>>. Acesso em: 30 ago. 2019.

FONTANAY, S. et al. Ursolic, oleanolic and betulinic acids: Antibacterial spectra and selectivity indexes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, n. 2, p. 272–276, 2008.

FUNDAÇÃO SOS MATA ATLÂNTICA; INSTITUTO NACIONAL DE PESQUISAS ESPACIAIS (INPE). **Atlas dos remanescentes florestais da Mata Atlântica: Período 2017-2018**. São Paulo, 2019.

FOUAD, R. et al. Chemical composition and herbicidal effects of essential oils of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf, *Eucalyptus cladocalyx*, *Origanum vulgare* L and *Artemisia absinthium* L. cultivated in Morocco. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 18, n. 1, p. 112–123, 2015.

GALLUCCI, M. N. et al. Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 24, n. 6, p. 348–354, 2009.

GHNAYA, A. B. et al. Study of allelopathic effects of *Eucalyptus erythrocorys* L. crude extracts against germination and seedling growth of weeds and wheat. **Natural Product Research**, v. 30, n. 18, p. 2058–2064, 2015.



GIORDANI, M. A. et al. Hydroethanolic extract of the inner stem bark of *Cedrela odorata* has low toxicity and reduces hyperglycemia induced by an overload of sucrose and glucose. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 162, p. 352–361, 2015.

GOMAA, N. H. et al. Allelopathic effects of *Sonchus oleraceus* L. on the germination and seedling growth of crop and weed species. **Acta Botanica Brasilica**, v. 28, n. 3, p. 408–416, 2014.

GOUVEA, D. R. et al. Variações do metabolismo secundário vegetal: Exemplos com plantas nativas do Brasil. In: YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 5. ed. Itajaí: Univali, 2016, p. 399–420.

GRANDI, T. S. M. **Tratado das Plantas Medicinais**: Mineiras, Nativas e Cultivadas. Belo Horizonte: Adaequatio Estúdio, 2014.

GREAY, S. J.; HAMMER, K. A. Recent developments in the bioactivity of mono- and diterpenes: Anticancer and antimicrobial activity. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, n. 1, p. 1–6, 2015.

GUILHON, C. C. et al. Central antinociceptive and mechanism of action of *Pereskia bleo* Kunth leaves crude extract, fractions, and isolated compounds. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, p. 1–12, 2015.

GULATI, M.; NOBILE, C. J. *Candida albicans* biofilms: development, regulation, and molecular mechanisms. **Microbes and Infection**, v. 18, n. 5, p. 310–321, 2016.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical methods**: A guide to modern techniques of plant analysis. 2. ed. Dordrecht: Springer Netherlands, 1984.

HARNACK, L. J.; RYDELL, S. A.; STANG, J. Prevalence of use of herbal products by adults in the Minneapolis/St Paul, Minn, metropolitan area. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 76, n. 7, p. 688–694, 2001.

HARVEY, A. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19–20, p. 894–901, 2008.

HEINZANN, B. M.; SPITZER, V.; SIMÕES, C. M. O. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia**: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: Artmed, 2017, p. 168–184.

HOLAPPA, L. D.; BLUM, U. Effects of exogenously applied ferulic acid, a potential allelopathic compound, on leaf growth, water utilization, and endogenous abscisic acid levels of tomato, cucumber, and bean. **Journal of Chemical Ecology**, v. 17, n. 5, p. 865–886, 1991.

HWANG, S.-W. et al. Comparison of tyrosinase inhibitory effect of the natural antioxidants from *Cedrela sinensis*. **Journal of Applied Biological Chemistry**, v. 48, n. 3, p. 144–147, 2005.



JIMENEZ, A. et al. Insecticidal limonoids from *Swietenia humilis* and *Cedrela salvadorensis*. **Journal of Chemical Ecology**, v. 23, n. 5, p. 1225–1234, 1997.

KAZAMA, C. C. et al. Involvement of arginine-vasopressin in the diuretic and hypotensive effects of *Pereskia grandifolia* Haw. (Cactaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 1, p. 86–93, 2012.

KHAN, N. et al. Ethnobotanical and antimicrobial study of some selected medicinal plants used in Khyber Pakhtunkhwa (KPK) as a potential source to cure infectious diseases. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 122, 2014.

KIM, S.-Y. et al. Anti-obesity effects of Yerba Mate (*Ilex Paraguariensis*): a randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 15, n. 1, 2015.

KNUDSEN, C. G. et al. Discovery of the triketone class of HPPD inhibiting herbicides and their relationship to naturally occurring  $\beta$ -triketones. In: NARWAL, S. S. et al. **Allelopathy in Ecological Agriculture and Forestry**, 2000, p. 101-111.

KOHEN, R.; NYSKA, A. Oxidation of biological systems: Oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicologic Pathology**, v. 30, n. 6, p. 620–650, 2002.

KOLEVA, I. I. et al. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochemical Analysis**, v. 13, n. 1, p. 8–17, 2002.

KUNGEL, P. T. A. N. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of a purified polysaccharide from yerba mate (*Ilex paraguariensis*). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 114, p. 1161–1167, 2018.

LAGO, J. H. G. et al. Volatile oils from leaves and stem barks of *Cedrela fissilis* (Meliaceae): chemical composition and antibacterial activities. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 19, n. 5, p. 448–451, 2004.

LEITE, A. C. et al. Limonoids from *Cipadessa fruticosa* and *Cedrela fissilis* and their insecticidal activity. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, n. 6b, p. 1391–1395, 2005.

LEITE, A. et al. Trypanocidal activity of limonoids and triterpenes from *Cedrela fissilis*. **Planta Medica**, v. 74, n. 15, p. 1795–1799, 2008.

de LIMA, M. E. et al. *Ilex paraguariensis* extracts reduce blood glucose, peripheral neuropathy and oxidative damage in male mice exposed to streptozotocin. **Journal of Functional Foods**, v. 44, p. 9–16, 2018.

de LEO et al. *Cedrela* and *Toona* genera: a rich source of bioactive limonoids and triterpenoids. **Phytochemistry Reviews**, v. 17, n. 4, p. 751–783, 2018.

LI, H.-H. et al. Interactions of *trans*-cinnamic acid, its related phenolic allelochemicals, and abscisic acid in seedling growth and seed germination of lettuce. **Journal of Chemical Ecology**, v. 19, n. 8, p. 1775–1787, 1993.

LICHTENTHALER, H. K.; BUSCHMANN, C. Chlorophylls and carotenoids: measurement and characterization by UV-VIS spectroscopy. **Current Protocols in Food Analytical Chemistry**, v. 1, n. 1, p. F4.3.1-F4.3.8, 2001.

LIN, Q. et al. Chemical composition and anti-bacterial activity of essential oil from *Cedrela sinensis* (A. Juss.) Roem. seed. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 7, 2012.

LOPES, J. L. C. Cromatografia em Camada Delgada. In: COLLINS, C. H.; BRAGA G. L.; BONATO, P. S. **Fundamentos em Cromatografia**. Campinas: editora da Unicamp, 2006, p.67-86.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 5 ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2008.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. de A. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas. 2 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

LUZ, A. B. G. et al. The anti-inflammatory effect of *Ilex paraguariensis* A. St. Hil (Mate) in a murine model of pleurisy. **International Immunopharmacology**, v. 36, p. 165–172, 2016.

MA, C. et al. A review on *Annona squamosa* L.: Phytochemicals and biological activities. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 45, n. 05, p. 933–964, 2017.

MACEDO, M. L. R. et al. Extratos vegetais de espécies de plantas do cerrado sul-matogrossense com potencial de bioherbicida e bioinseticida. **Uniciências**, v. 21, n. 1, p. 25-34, 2017.

MACÍAS, F. A. et al. The use of allelopathic studies in the search for natural herbicides. **Journal of Crop Production**, v. 4, n. 2, p. 237–255, 2001.

MACÍAS, F. A. et al. Allelopathy – a natural alternative for weed control. **Pest Management Science**, v. 63, p. 327-348, 2007.

MACKEEN, M. M. et al. Antimicrobial, antioxidant, antitumour-promoting and cytotoxic activities of different plant part extracts of *Garcinia atroviridis* Griff. ex T. Anders. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 72, n. 3, p. 395–402, 2000.

MACKINNON, S. et al. Antimalarial activity of tropical Meliaceae extracts and gedunin derivatives. **Journal of Natural Products**, v. 60, n. 4, p. 336–341, 1997.

de MADUREIRA, M. DO C. et al. Antimalarial activity of medicinal plants used in traditional medicine in S. Tomé and Príncipe islands. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, n. 1, p. 23–29, 2002.

MAGUIRE, J. D. Speed of germination-aid in selection and evaluation for seedling emergence and vigor. **Crop Science**, v. 2, n. 1, p. 176-177, 1962.

MAIA, B. H. L. N. S. et al. Essential oils of *Toona* and *Cedrela* species (Meliaceae): taxonomic and ecological implications. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 11, n. 6, p. 629-639, 2000.

MATOS, A. P. **Busca de compostos inseticidas**: estudo de espécies do gênero *Trichilia* (Meliaceae). 170 f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

MATOS, A. P. et al. Atividade de *Cedrela fissilis* e *Cipadessa fruticosa* (Meliaceae) sobre a lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J.E. Smith) (Lepidoptera: Noctuidae). **BioAssay**, v. 5, 2010.

MCKERROW, J. H. Recognition of the role of natural products as drugs to treat neglected tropical diseases by the 2015 Nobel prize in physiology or medicine. **Natural Product Reports**, v. 32, n. 12, p. 1610-1611, 2015.

MEDINI, F. et al. Total phenolic, flavonoid and tannin contents and antioxidant and antimicrobial activities of organic extracts of shoots of the plant *Limonium delicatulum*. **Journal of Taibah University for Science**, v. 8, n. 3, p. 216-224, 2014.

de MELLO, J. C. P.; SANTOS, S. da C. Taninos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia**: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: Artmed, 2017, p. 235-248.

MENDES, I. D. S.; REZENDE, M. O. O. Assessment of the allelopathic effect of leaf and seed extracts of *Canavalia ensiformis* as postemergent bioherbicides: A green alternative for sustainable agriculture. **Journal of Environmental Science and Health**, Part B, v. 49, n. 5, p. 374-380, 2014.

MENEZES, F. de S. et al. Hypoglycemic activity of two brazilian *Bauhinia* species: *Bauhinia forficata* L. and *Bauhinia monandra* Kurz. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 8-13, 2007.

MENSOR, L. L. et al. Screening of brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 2, p. 127-130, 2001.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P. R.; van BEEK, T. A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**, v. 85, n. 2, p. 231-237, 2004.

MITCHELL, G. et al. Mesotrione: A new selective herbicide for use in maize. **Pest Management Science**, v. 57, n. 2, p. 120-128, 2001.

MOJZER, E. B. et al. Polyphenols: Extraction methods, antioxidative action, bioavailability and anticarcinogenic effects. **Molecules**, v. 21, n. 7, p. 901, 2016.

MORAES, R. M. et al. Pesticidas naturais derivados de plantas: Descoberta e usos. In: HALFELD-VIEIRA, B. de A. et al. **Defensivos agrícolas naturais: Uso e perspectivas**. Brasília: Embrapa, 2016.

MUELLNER, A. N. et al. Biogeography of *Cedrela* (Meliaceae, Sapindales) in Central and South America. **American Journal of Botany**, v. 97, n. 3, p. 511–518, 2010.

MUKHERJEE, P. K. et al. Paradigm shift in natural product research: traditional medicine inspired approaches. **Phytochemistry Reviews**, v. 16, n. 5, p. 803–826, 2017.

MYERS, N. et al. Biodiversity hotspots for conservation priorities. **Nature**, v. 403, n. 6772, p. 853–858, 2000.

NASCIMENTO, S. R. do. **Avaliação da atividade antinociceptiva de compostos derivados da *Parapiptadenia rigida* e *Cedrela fissilis* em ensaios farmacológicos “in vivo”**. 85 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Biotecnologia) - Universidade do Oeste de Santa Catarina, Videira, 2016.

NICHOLLS, W. H. A fronteira agrícola na história recente do Brasil: O estado do Paraná, 1920-65. **Revista Brasileira de Economia**, v. 24, n. 4, p. 33-91, 1970.

NIJVELDT, R. J. et al. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, n. 4, p. 418–425, 2001.

NILE, S. H.; NILE, A. S.; KEUM, Y.-S. Total phenolics, antioxidant, antitumor, and enzyme inhibitory activity of indian medicinal and aromatic plants extracted with different extraction methods. **3 Biotech**, v. 7, n. 1, p. 76, 2017.

NOHYNEK, L. J. et al. Berry phenolics: Antimicrobial properties and mechanisms of action against severe human pathogens. **Nutrition and Cancer**, v. 54, n. 1, p. 18–32, 2006.

NORES, M. M. et al. Immunomodulatory activities of *Cedrela lilloi* and *Trichilia elegans* aqueous leaf extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 55, n. 2, p. 99–106, 1997.

NUNES, E. C. et al. Micropropagation of *Cedrela fissilis* Vell. (Meliaceae). In: MAASSEN, P.; OLSEN, J. P. **University dynamics and European integration**, Dordrecht: Springer, 2007, p. 221-237 (e-book).

NURESTRI, A. M. S.; SIM, K. S.; NORHANOM, A. W. Phytochemical and cytotoxic investigations of *Pereskia grandifolia* Haw. (Cactaceae) leaves. **Journal of Biological Sciences**, v. 9, n. 5, p. 488–493, 2009.

NURESTRI, A. M. S.; NORHANOM, A.; SIM, K. Phenolic content and antioxidant activity of *Pereskia grandifolia* Haw. (Cactaceae) extracts. **Pharmacognosy Magazine**, v. 6, n. 23, p. 248, 2010.

OLIVEIRA, S. G. D. et al. An ethnomedicinal survey on phytotherapy with professionals and patients from Basic Care Units in the Brazilian Unified Health System. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, n. 2, p. 428–437, 2012.

ORDOÑEZ, A. et al. Antioxidant activities of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz extracts. **Food Chemistry**, v. 97, n. 3, p. 452–458, 2006.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS). **General guidelines for methodologies on research and evaluation of traditional medicine**. Genebra: WHO, 2000.

ORMOND, J. G. P. Glossário de termos usados em atividades agropecuárias, florestais e ciências ambientais. Rio de Janeiro: BNDES, 2006. Ebook. Disponível em: <[https://www.mma.gov.br/estruturas/sqa\\_pnla/\\_arquivos/glossrio\\_bndes\\_textodoc\\_46.pdf](https://www.mma.gov.br/estruturas/sqa_pnla/_arquivos/glossrio_bndes_textodoc_46.pdf)>. Acesso em: 21 ago. 2019.

PADUCH, R. et al. Terpenes: substances useful in human healthcare. **Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis**, v. 55, n. 5, p. 315, 2007.

PASSOS, G. F. et al. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenacea*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 2, p. 323–333, 2007.

PEREIRA, A. C. S. et al. Atividade biológica do extrato hidroalcoólico de *Bauhinia forficata* Link sobre *Herpetomonas samuelpessoai* (Galvão.) Roitman. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 16, n. 3, p. 585–592, 2014.

PERVEEN, F. et al. Antioxidant and DNA protection activities of the hill toon, *Cedrela serrata* (Royle) leaves extract and its fractions. **Journal of Natural Products**, v. 5, p. 207–213, 2012.

PETROVSKA, B. Historical review of medicinal plants' usage. **Pharmacognosy Reviews**, v. 6, n. 11, p. 1, 2012.

PHARM, R. P. B. et al. Resveratrol: Review on therapeutic potential and recent advances in drug delivery. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 11, n. 8, p. 1285–1298, 2014.

PILATTI, D. M. et al. Comparison of the phytochemical profiles of five native plant species in two different forest formations. **Brazilian Journal of Biology**, 2018.

PINTO, N. de C. C. et al. *Pereskia aculeata* Miller leaves present in vivo topical anti-inflammatory activity in models of acute and chronic dermatitis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 330–337, 2015.

PINTO, N. de C. C. et al. *Pereskia aculeata* Miller leaves accelerate excisional wound healing in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, p. 131–136, 2016.

POPOVA, M. P. et al. Terpenes with antimicrobial activity from Cretan propolis. **Phytochemistry**, v. 70, n. 10, p. 1262–1271, 2009.

van POSER, G. L. A quimiotaxonomia na sistemática dos seres vivos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017, p. 23-28.

POURMORAD, F.; HOSSEINIMEHR, S. J.; SHAHABIMAJD, N. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 11, 2006.

PUUPPONEN-PIMIA, R. et al. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n. 4, p. 494–507, 2001.

QIN, F.; LIU, S.; YU, S. Effects of allelopathy and competition for water and nutrients on survival and growth of tree species in *Eucalyptus urophylla* plantations. **Forest Ecology and Management**, v. 424, p. 387–395, 2018.

QUEIROZ, E. F. et al. Princípios ativos de plantas superiores. In: \_\_\_\_\_. **Série de Textos da Escola de Verão de Química**. 2. ed. São Carlos: Edufscar, 2014. Volume 4.

RADHAKRISHNAN, R.; ALQARAWI, A. A.; ABD-ALLAH, E. F. Bioherbicides: Current knowledge on weed control mechanism. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 158, p. 131–138, 2018.

RASHED, K. R. Antioxidant potential of *Cedrela odorata* stems extracts and bio active phytoconstituents. **Hygeia: journal for drugs and medicines**, v. 6, n. 1, p. 25–30, 2014.

REGINATTO, F. H. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017, p. 69-81.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 7, p. 933–956, 1996.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, n. 4, p. 152-159, 1997.

ROBARDS, K.; ANTOLOVICH, M. Analytical Chemistry of Fruit BioflavonoidsA Review. **The Analyst**, v. 122, n. 2, p. 11R-34R, 1997.

ROSAS-PIÑÓN, Y. et al. Ethnobotanical survey and antibacterial activity of plants used in the Altiplane region of Mexico for the treatment of oral cavity infections. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, n. 3, p. 860–865, 2012.

ROSENBERGER, M. G. **Atividade antimicrobiana de cogumelos (agaricales) nativos da floresta estacional do oeste do Paraná**. 101f. Dissertação (Mestrado



em Botânica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, Palotina, 2018.

SAHOO, N.; MANCHIKANTI, P.; DEY, S. Herbal drugs: Standards and regulation. **Fitoterapia**, v. 81, n. 6, p. 462–471, 2010.

SAJEESH, T.; ARUNACHALAM, K.; PARIMELAZHAGAN, T. Antioxidant and antipyretic studies on *Pothos scandens* L. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, n. 11, p. 889–899, 2011.

SALGUEIRO, A. C. F. et al. Effects of *Bauhinia forficata* tea on oxidative stress and liver damage in diabetic mice. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, p. 1–9, 2016.

SANTOS, C. A. de M.; REICHERT, C. L.; SANTOS, T. G. Alcaloides isoquinolínicos. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia**: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: Artmed, 2017, p. 331–347.

SCHINELLA, G.; FANTINELLI, J. C.; MOSCA, S. M. Cardioprotective effects of *Ilex paraguariensis* extract: evidence for a nitric oxide-dependent mechanism. **Clinical Nutrition**, v. 24, n. 3, p. 360–366, 2005.

SCOTT, A. J.; KNOTT, M. A Cluster analysis method for grouping means in the analysis of variance. **Biometrics**, v. 30, n. 3, p. 507, 1974.

SHAHIDI, F.; AMBIGAIPALAN, P. Phenolics and polyphenolics in foods, beverages and spices: Antioxidant activity and health effects – A review. **Journal of Functional Foods**, v. 18, p. 820–897, 2015.

SHOKEEN, P.; BALA, M.; TANDON, V. Evaluation of the activity of 16 medicinal plants against *Neisseria gonorrhoeae*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 33, n. 1, p. 86–91, 2009.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, v. 299, p.152–178, 1999. Elsevier.

SOLVENT Polarity Table - Miller's Home. Disponível em: <<https://sites.google.com/site/miller00828/in/solvent-polarity-table>>. Acesso em: 24/2/2019.

de SOUSA, M. V. et al. Allelopathy of the leaf extract of eucalyptus genetic material on the physiological performance of millet seeds. **American Journal of Plant Sciences**, v. 09, n. 01, p. 34–45, 2018.

STALIKAS, C. D. Extraction, separation, and detection methods for phenolic acids and flavonoids. **Journal of Separation Science**, v. 30, n. 18, p. 3268–3295, 2007.



STEHMANN, J. R.; SOBRAL, M. Biodiversidade no Brasil. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia**: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: Artmed, 2017, p. 1-10.

SULTANA, B.; ANWAR, F.; ASHRAF, M. Effect of extraction solvent/technique on the antioxidant activity of selected medicinal plant extracts. **Molecules**, v. 14, n. 6, p. 2167–2180, 2009.

SWAIN, T. N. Fronteiras do Paraná: da colonização à migração. In: AUBERTIN, C. et al. **Fronteiras**. Brasília: Editora Universidade de Brasília, 1988, p. 19-37.

SWIECH, J. N. D. **Avaliação química e biológica de *Philodendron meridionale* Buturi & Sakur (Araceae)**. 171 f. Teses (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2018.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Metabólitos secundários e a defesa vegetal. In: \_\_\_\_\_. **Fisiologia Vegetal**. Tradução de: SANTARÉM, E. R. et al. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009, p. 342-372. Título original: Plant physiology.

TAKAHASHI, M. et al. *In vitro* screening of leishmanicidal activity in Myanmar timber extracts. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 27, n. 6, p. 921–925, 2004.

TROPICOS. Missouri Botanical Garden. Disponível em: <<http://www.tropicos.org>>. Acesso em: 10 set. 2019.

TU, Y. The discovery of artemisinin (qinghaosu) and gifts from Chinese medicine. **Nature Medicine**, v. 17, n. 10, p. 1217–1220, 2011.

TZIMA, K.; BRUNTON, N.; RAI, D. Qualitative and quantitative analysis of polyphenols in lamiaceae plants - A review. **Plants**, v. 7, n. 2, p. 25, 2018.

VALGAS, C. et al. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 369–380, 2007.

VARONI, E. M. et al. Anticancer molecular mechanisms of resveratrol. **Frontiers in Nutrition**, v. 3, 2016.

VENEGAS-GONZÁLEZ, A. et al. Drought and climate change incidence on hotspot *Cedrela* forests from the Mata Atlântica biome in southeastern Brazil. **Global Ecology and Conservation**, v. 15, p. e00408, 2018.

VENUGOPALA, K. N.; RASHMI, V.; ODHAV, B. Review on natural coumarin lead compounds for their pharmacological activity. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 1–14, 2013.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

VILLANUEVA, H. E. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the bark essential oil of *Cedrela odorata* from Monteverde, Costa Rica. **Der Pharma Chemica**, v. 1, n. 2, p. 14-18, 2009.

VOGEL, A. I. Cromatografia em camada fina. In: \_\_\_\_\_. **Análise química quantitativa**. Tradução de: AFONSO, J. C.; DE AGUIAR, P. F.; DE ALENCASTRO, R. B. 6. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2011, p. 138-143. Título original: Vogel's textbook of quantitative chemical analysis.

WALLER, G. R. Introduction - Reality and future of allelopathy. In: MACÍAS, F. A. et al. **Allelopathy: Chemistry and mode of action of allelochemicals**. CRC Press, 2004. p. 1-12.

WANI, M. C. et al. Plant antitumor agents. VI. Isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, n. 9, p. 2325–2327, 1971.

WINK, M. Modes of action of herbal medicines and plant secondary metabolites. **Medicines**, v. 2, n. 3, p. 251–286, 2015.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal of Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99–105, 1998.

WOLSKA, K. I. et al. Antibacterial activity of oleanolic and ursolic acids and their derivatives. **Central European Journal of Biology**, v. 5, n. 5, p. 543–553, 2010.

WU, W.-B. et al. New triterpenoids with protein tyrosine phosphatase 1B inhibition from *Cedrela odorata*. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 16, n. 7, p. 709–716, 2014.

XU, B. J.; CHANG, S. K. C. A Comparative study on phenolic profiles and antioxidant activities of legumes as affected by extraction solvents. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 2, p. S159–S166, 2007.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. Novas perspectivas dos produtos naturais na química medicinal moderna. In: \_\_\_\_\_. **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 5. ed. Itajaí: Univali, 2016, p.11-40.

ZAREISEDEHIZADEH, S.; TAN, C.-H.; KOH, H.-L. A review of botanical characteristics, traditional usage, chemical components, pharmacological activities, and safety of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 11, 2014.

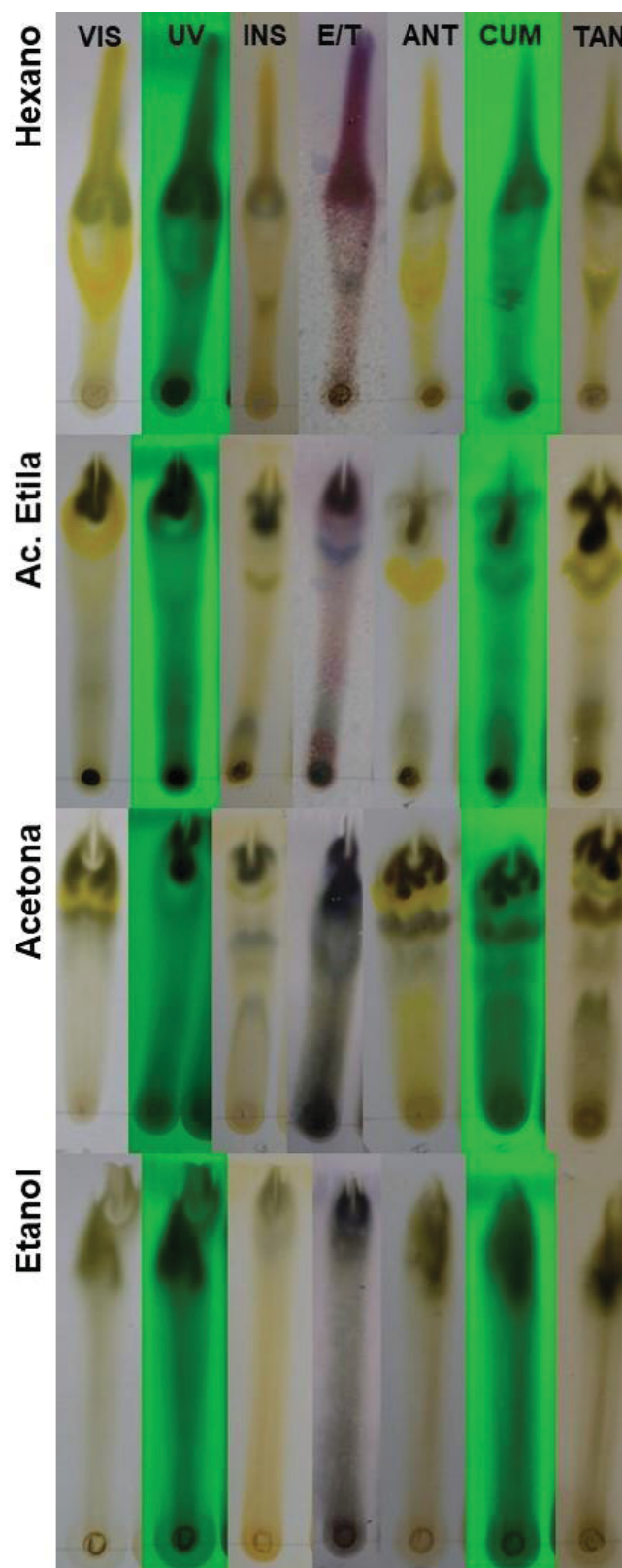
ZAVOI, S. et al. Comparative fingerprint and extraction yield of medicinal herb phenolics with hepatoprotective potential, as determined by UV-Vis and FT-MIR spectroscopy. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 39, n. 2, p. 82, 2011

ZELNIK, R.; ROSITO, C. M. Le fissinolide. **Tetrahedron Letters**, n. 52, p. 6441-6444, 1966.

ZUANAZZI, J. Â. S.; MONTANHA, J. A.; ZUCOLOTTO, S. M. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia**: do produto natural ao medicamento. Porto Alegre: Artmed, 2017, p. 209-233.

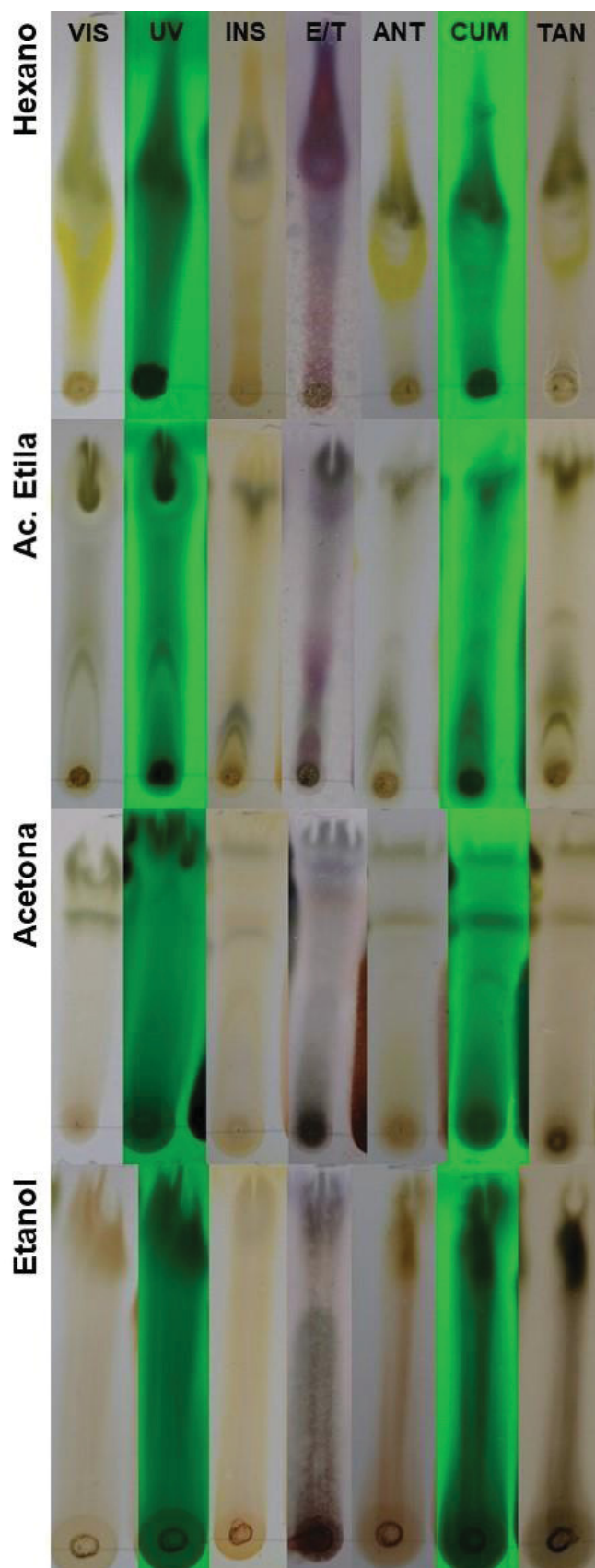
## APÊNDICE – SCREENING DOS EXTRATOS ORGÂNICOS DO CEDRO

Screening fitoquímico dos extratos orgânicos das folhas do cedro obtidos por Soxhlet



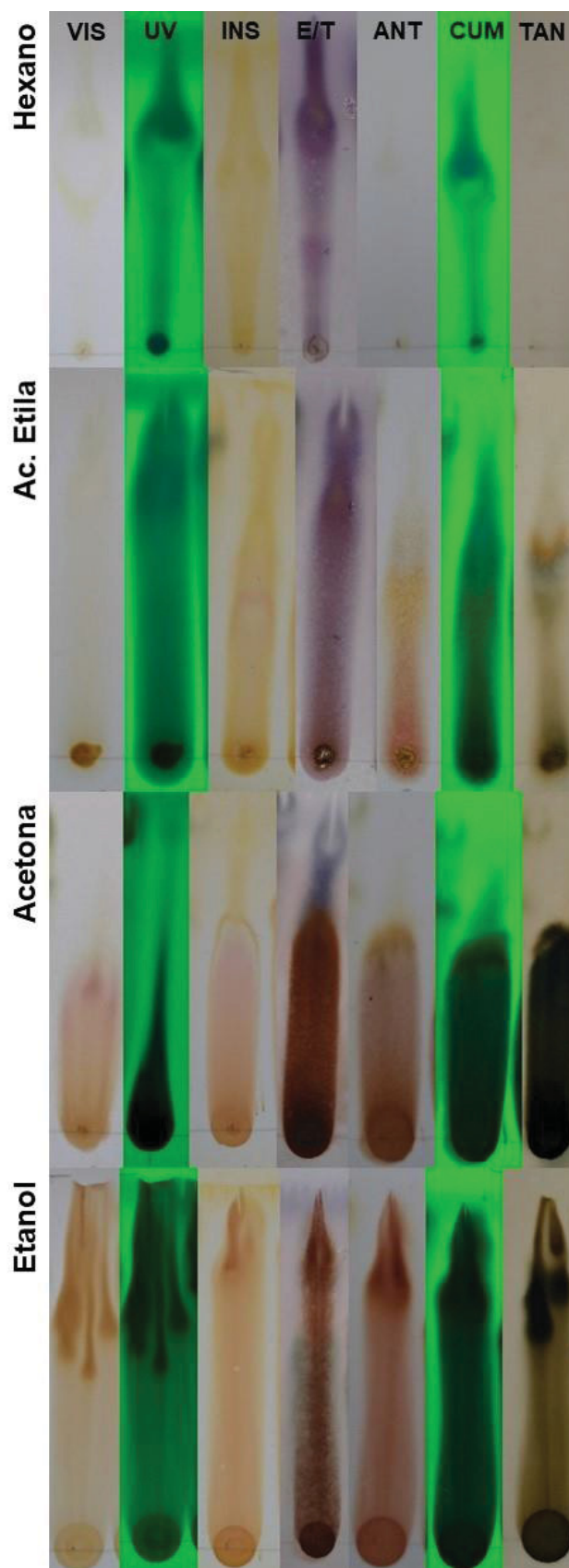
LEGENDA: VIS: CCD observada sob luz visível; UV: CCD observada sob luz ultravioleta; INS: Compostos insaturados; E/T: Esteroides/Terpenos; ANT: Antraquinonas; CUM – Cumarinas; TAN – Taninos e compostos fenólicos.

Screening fitoquímico dos extratos orgânicos dos pecíolos do cedro obtidos por soxhlet



LEGENDA: VIS: CCD observada sob luz visível; UV: CCD observada sob luz ultravioleta; INS: Compostos insaturados; E/T: Esteroides/Terpenos; ANT: Antraquinonas; CUM – Cumarinas; TAN – Taninos e compostos fenólicos.

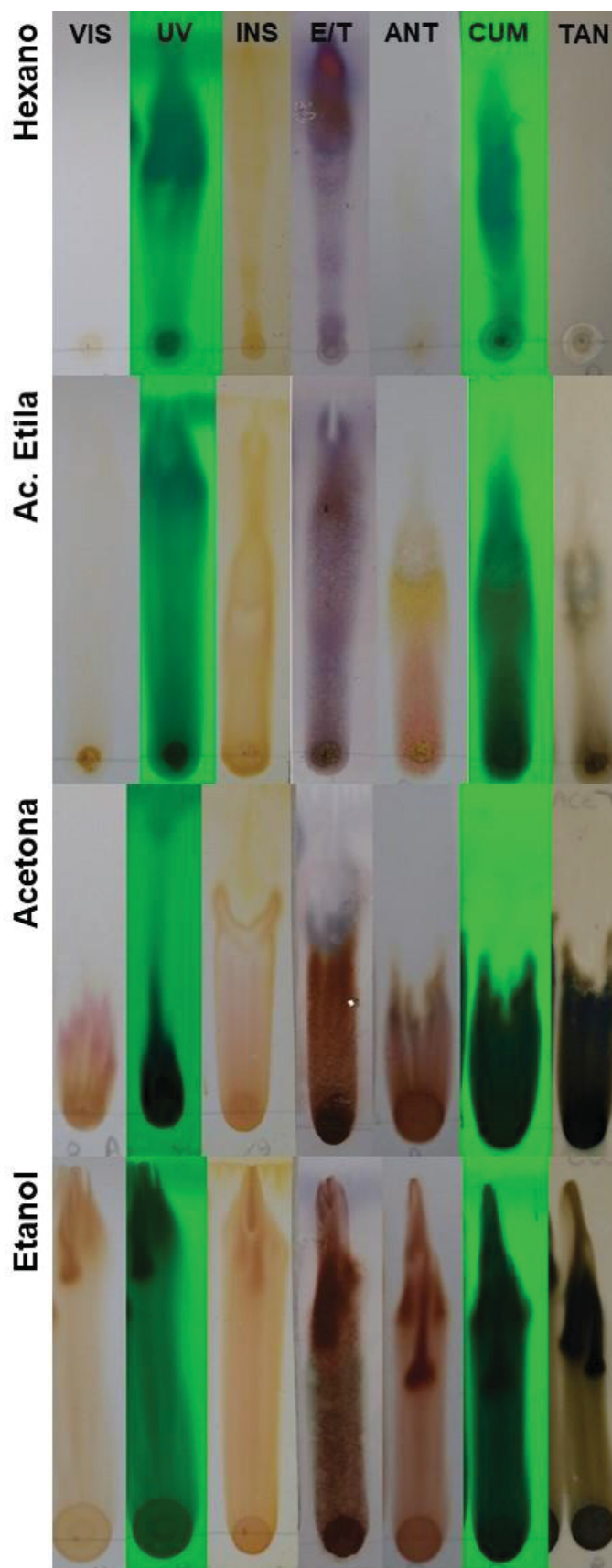
Screening fitoquímico dos extratos orgânicos das cascas do cedro obtidos por Soxhlet



LEGENDA: VIS: CCD observada sob luz visível; UV: CCD observada sob luz ultravioleta; INS: Compostos insaturados; E/T: Esteroides/Terpenos; ANT: Antraquinonas; CUM – Cumarinas; TAN – Taninos e compostos fenólicos.



Screening fitoquímico dos extratos orgânicos das raízes do cedro obtidos por Soxhlet



LEGENDA: VIS: CCD observada sob luz visível; UV: CCD observada sob luz ultravioleta; INS: Compostos insaturados; E/T: Esteroides/Terpenos; ANT: Antraquinonas; CUM – Cumarinas; TAN – Taninos e compostos fenólicos.